



Etude des réseaux d'interactions protéiques impliqués dans le trafic du nickel et de l'ammoniac et de leurs rôles dans la virulence chez *Helicobacter pylori*

Julien Gallaud

► To cite this version:

Julien Gallaud. Etude des réseaux d'interactions protéiques impliqués dans le trafic du nickel et de l'ammoniac et de leurs rôles dans la virulence chez *Helicobacter pylori*. Bactériologie. Université Paris Diderot Paris 7, 2012. Français. NNT: . tel-01175673

HAL Id: tel-01175673

<https://theses.hal.science/tel-01175673>

Submitted on 11 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS • DIDEROT (PARIS 7)

Ecole Doctorale Biochimie, Biothérapies, Biologie
Moléculaire et Infectiologie

Présentée par

JULIEN GALLAUD

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Diderot

Spécialité Microbiologie Procaryote et Eucaryote

Sujet de la thèse :

**Etude des réseaux d'interactions protéiques impliqués
dans le trafic du nickel et de l'ammoniac et de leurs
rôles dans la virulence chez *Helicobacter pylori***

Soutenue publiquement le 26 septembre 2012,
devant le jury composé de :

Pr Isabelle MARTIN-VERSTRAETE
Pr Frédéric BARRAS
Pr Christophe BURUCOA
Dr Christine CAVAZZA
Dr Daniel LADANT
Dr Hilde DE REUSE

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

**« L'art est fait pour troubler.
La science rassure. »**

Georges Braque

*À mes parents,
À mes grands-parents.*

Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer cette thèse : la présidente, le Pr Isabelle Martin-Verstraete, et mes rapporteurs, le Pr Frédéric Barras et le Pr Christophe Burucoa. J'adresse mes remerciements tous particuliers au Dr Christine Cavazza et au Dr Daniel Ladant qui ont accepté d'être examinateurs de cette thèse. Pour la plupart d'entre vous, j'ai eu le plaisir de travailler à vos côtés ; vos remarques constructives et bienveillantes sur les projets que nous avons pu mener ensemble ont souvent apporté un éclairage nouveau et averti, et je vous en remercie encore.

Je remercie ensuite ma directrice de thèse, Hilde De Reuse. Merci pour la confiance que tu m'as témoigné dès le master et pour ton optimisme à l'épreuve de tout. Le chemin vers l'aboutissement de cette thèse est loin d'avoir été droit, mais nous y sommes parvenus. Merci pour ces trois ans.

Un immense merci à Damien Leduc qui m'a tant appris. A vrai dire, tu m'as tellement appris, qu'une fois parti je me suis empressé de tout faire différemment ; oubliée ton obsession des solutions extemporanées et des cultures bactériennes minutées. Peut-être parce qu'au-delà de la science, je me souviens surtout de ta patience, de ton sens aiguisé de la pédagogie, et de ton amour immodéré (suspect) pour Linux. Mais par-dessus tout, c'est ton ouverture d'esprit – bienvenue dans le monde de la Science – et ta gentillesse qui m'auront le plus aidé à parachever ce travail ; *câlins*.

Merci infiniment à Sylvie Aubert. Tes conseils au quotidien – pour la Science et pour le reste – et nos repas que personne ne nous envie dans notre chaleureux *espace détente du bout du couloir*. Parce que nous avons la même vision des choses et que grâce à toi, je me suis surtout senti moins seul ; je n'aurais pas pu seulement compter sur Radio Classique pour rendre ces trois années agréables, tu y as contribué pour beaucoup. Et aussi car nous sommes convaincus que la Science n'est pas tout.

Merci à Daniel Vinella qui apporte, en plus de son sens critique supra-aiguisé, sa pierre à l'édifice de cette thèse en ayant réalisé un nombre impressionnant de dosages β -galactosidase. Rien que pour avoir fait cela, tu t'assures mon admiration indéfectible, nonobstant tes vues non dissimulées sur ma paillasse alors que je n'ai pas encore quitté le labo.

Merci à Pierre Richaud dont l'implication tout au long de ce travail a permis de mener à bien ce projet, parfois dans l'urgence. Merci pour ta réactivité et tes mots réconfortants lorsqu'il a fallu recommencer tant de choses, tant de fois...

Merci à Céline Brochier-Armanet pour son travail – en urgence – à la fin de ce projet et les perspectives prometteuses sur lequel il débouche.

Enfin, un grand merci à Gouzel Karimova pour m'avoir enseigné le double hybride là où il est né. Travailler avec toi a été un plaisir immense. Ton implication dans ce travail quand « controls [were] for babies » et qu'il y eut des « weak interactions » a été un atout précieux.

Je n'oublie pas les autres membres de l'Unité de Pathogenèse de *Helicobacter*, encore présents ou juste de passage ; Catherine, Marie, Andrea. En premier lieu Eliette et Valérie, le binôme de choc. Merci Eliette pour ces bonnes adresses dans les villes européennes. Julien, Marta, et surtout Joana. Votre bonne humeur, les cours de portugais (*dulsaõ*), le thé de 16 heures et les traductions de l'horoscope ont véritablement égayé ces trois ans, notamment dans les moments difficiles. Karine, merci pour ta bonne humeur et ton attitude positive malgré les litres de milieu que je t'ai fait couler à ton arrivée. Merci pour ta présence antimorosité dans notre bureau déprimant. Un grand merci à nos secrétaires de choc, Mireille, Pascale et avant elles Marie-Christine (M-C GaGa ZinZin). Grâce à vous la vie est véritablement plus facile.

Merci au laboratoire de préparation : Claudette, Isabel, Lilia, Nadia, Sabine. Votre travail au quotidien et votre professionnalisme (avec le sourire) facilitent considérablement la vie; que pourrions-nous faire sans vous ?

Enfin je tiens à remercier toutes les personnes qui auront, par leur aide technique, ou leur soutien au quotidien, contribué à la réalisation de cette thèse ; je pense notamment à nos voisins du G5 de Biologie & Génétique de la Paroi Bactérienne ou aux membres exilés de l'Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram Positif.

Mes dernières pensées vont à mes amis, camarades galériens de thèse, Toan, Camille et Nora en tête. Et puis aux autres : à Marion, aux Sébastien(s), à Patrick, aux Olivier(s), aux Philippe(s), Mathieu(s/x), Romain(s), François. Christian, Michel, n'Alexandre, et Richard, évidemment ; Supposer que cette thèse aurait été possible sans votre soutien, votre amitié et parfois plus, serait se leurrer. Vous croyez en moi au-delà du raisonnable et vous m'avez rendu fort. La musique adoucissant les mœurs (imaginez-moi sans alors) mention doit être faite de ces longues soirées en solitaire ou en bonne compagnie à l'Opéra, à la Salle Pleyel ou au Théâtre de la Ville.

Et puis en dernier lieu, je remercie mes parents et mes grands-parents, sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre soutien jour après jour. Je ne suis pas certain que vous ayez toujours su où j'allais mais vous m'avez toujours soutenu. Je vous suis redevable de tout et vous m'avez donné ce qu'on n'apprend pas, même en doctorat, des valeurs. Cette thèse vous est dédiée.

Résumé

Helicobacter pylori est la seule bactérie capable de coloniser de façon persistante l'estomac humain. L'infection au long cours au contact de la muqueuse gastrique provoque diverses pathologies gastriques comme les ulcères gastroduodénaux et les cancers gastriques. Pour résister au stress acide rencontré dans sa niche, *H. pylori* possède une réponse d'urgence qui dépend de l'uréase. Cette enzyme abondante et très active, est responsable d'une forte production d'ammoniac. En conditions acides, l'ammoniac permet à *H. pylori* le maintien d'un pH neutre dans son cytoplasme.

L'uréase et une autre enzyme essentielle à la colonisation, l'hydrogénase à [NiFe], possèdent des centres catalytiques à nickel. De par l'abondance de ces deux protéines, ainsi que leur importance fonctionnelle, de grandes quantités de nickel sont nécessaires à *H. pylori* pour établir une colonisation durable.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux réseaux d'interactions protéiques impliquées dans le trafic de l'ammoniac et du nickel chez *H. pylori* et à leurs rôles dans la pathogenèse.

Pour survivre, *H. pylori* doit importer du nickel puis l'insérer correctement au sein des deux enzymes à nickel. De plus, ce métal doit être stocké pour éviter les effets délétères qu'il peut occasionner. Nous avons étudié le rôle de deux protéines riches en histidine, Hpn et Hpn-2. Nous avons montré que ces protéines interagissent entre elles, interviennent dans le maintien de l'homéostasie et du stockage du nickel et agissent comme régulateurs de l'activité uréasique. De plus, ces deux protéines sont essentielles à la colonisation du modèle animal.

Parallèlement, nous avons caractérisé deux systèmes uniques d'hydrolyse périplasmique de l'asparagine et de la glutamine associés à la production d'ammoniac. Ces enzymes sont couplées à un import de leurs produits, l'aspartate et le glutamate dans la cellule. Ces couples déamidases/transporteurs sont essentiels à la colonisation et jouent un rôle dans la pathogénicité de *H. pylori*.

L'uréase, les déamidases et d'autres enzymes participant au métabolisme de la glutamine et de l'asparagine sont responsables d'une importante production d'ammoniac par *H. pylori*. En utilisant le double hybride bactérien, des interactions entre des enzymes productrices d'ammoniac chez *H. pylori* et des enzymes qui l'utilisent comme substrat ont été mises en évidence. Nous proposons l'existence d'un *channeling* métabolique de l'ammoniac permettant d'optimiser la biodisponibilité de cette molécule et l'activité des enzymes correspondantes.

Nos résultats ont révélé l'existence d'interactions protéiques qui optimisent les flux d'ammoniac et de nickel, des éléments essentiels à la virulence de *H. pylori*.

Abstract

Helicobacter pylori is the only known bacterium that persistently colonizes the human stomach. Long-term infection of the gastric mucosa causes various pathologies such as peptic ulcers and adenocarcinoma. To resist acid stress encountered in its niche, *H. pylori* has an emergency response based on the activity of urease, an abundant and very active enzyme that synthesizes ammonia. Upon acid exposure, ammonia allows *H. pylori* to maintain a neutral pH in its cytoplasm.

Urease and another enzyme essential for colonization, the [NiFe] hydrogenase, have a catalytic center coordinated with nickel. Because of the abundance of these two proteins and their functional importance, large amounts of nickel need to be acquired by *H. pylori* to establish colonization.

During this PhD, we have investigated the protein interaction networks involved in the trafficking of ammonia and of nickel in *H. pylori* and analyzed their role in virulence.

To survive, *H. pylori* needs to import nickel and insert it properly into the two nickel enzymes. In addition, this metal needs to be stored to prevent deleterious effects. We have studied the role of two histidine-rich proteins, Hpn and Hpn-2. We showed that these proteins interact each other and are involved in storage of nickel and control of its homeostasis. In addition, we found that they act as regulators of urease activity and are required for colonization of the animal model.

We also characterized two unique systems of periplasmic hydrolysis of asparagine and glutamine that produce ammonia. These enzymes are coupled with the transport of their products, aspartate and glutamate. These deamidase/transporter couples are essential for colonization and play a role in *H. pylori* pathogenicity.

Urease, the deamidases and other enzymes involved in the glutamine and asparagine metabolism are responsible for important ammonia production by *H. pylori*. Using the bacterial two-hybrid system, we found interactions between enzymes that produce ammonia and enzymes that utilize ammonia as a substrate. We propose the existence of a metabolic channeling of ammonia that functions to optimize its bioavailability and the activity of the corresponding enzymes.

Our results unraveled the existence of protein interactions that optimize ammonia and nickel fluxes, two elements that are essential for *H. pylori* virulence.

Table des matières

RESUME	9
ABSTRACT	10
TABLE DES MATIERES	11
LISTE DES ABREVIATIONS	15
LISTE DES FIGURES	16
LISTE DES TABLEUX	18
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	19
CHAPITRE 1. GENERALITES SUR <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	20
1. INTRODUCTION	20
2. CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'INFECTION	24
2.1. DESCRIPTION DE LA BACTERIE	24
2.2. MALADIES ASSOCIEES A L'INFECTION A <i>H. PYLORI</i>	25
2.3. TRAITEMENT DE L'INFECTION	27
3. FACTEURS IMPLIQUES DANS LA PATHOGENESE INDUITE PAR L'INFECTION	28
3.1. DETERMINANTS DE L'HOTE	28
3.2. DETERMINANTS BACTERIENS	32
CHAPITRE 2. LE METABOLISME DU NICKEL CHEZ <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	50
1. INTRODUCTION	50
1.1. DE L'IMPORTANCE DES METALLOENZYMES	50
1.2. HOMEOSTASIE DES METAUX CHEZ LES BACTERIES	51
1.3. LE NICKEL DANS LE MONDE BACTERIEN	55
2. LES ENZYMES CONTENANT DU NICKEL CHEZ <i>H. PYLORI</i>	58
2.1. L'UREASE	58
2.2. L'HYDROGENASE A [NiFe] DE <i>H. PYLORI</i>	63

3. GESTION DES FLUX DE NICKEL CHEZ <i>H. PYLORI</i>	70
3.1. IMPORTATION DU NICKEL AU TRAVERS DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE	70
3.2. EFFLUX	72
3.3. PROTEINES FIXANT LE NICKEL	72
4. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES PROTEINES RELIEES AU NICKEL	77
4.1. GENERALITES SUR NIKR	77
4.2. REGULATION FONCTIONNELLE DUE A NIKR	80
4.3. CINETIQUE DE LA REPOSE PAR NIKR	81
4.4. INTERCONNEXION DES CIRCUITS REGULATEURS	82
CONTEXTE ET QUESTIONS POSEES	84
DONNEES EXPERIMENTALES	86
CHAPITRE 1. HPN ET HPN-2, EFFECTEURS CENTRAUX DE LA REGULATION DE L'ACTIVITE UREASIQUE ET NOUVEAUX FACTEURS DE VIRULENCE	87
1. ELEMENTS DE CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	87
2. RESUME DES RESULTATS	89
2.1. DISTRIBUTION DE HPN ET HPN-2 DANS LE GENRE <i>HELICOBACTER</i>	89
2.2. ANALYSE DE LA CONSERVATION DE HPN ET HPN-2	91
2.3. ESSENTIALITE DE HPN ET HPN-2 POUR LA COLONISATION	92
2.4. IMPLICATION DE HPN ET HPN-2 DANS LA RESISTANCE AUX CONCENTRATIONS ELEVEES EN NICKEL, COBALT ET BISMUTH	93
2.5. MESURES DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN NICKEL DANS LES DIFFERENTS MUTANTS	93
2.6. ROLE DE HPN ET HPN-2 DANS LE CONTROLE DE L'ACTIVITE DE L'UREASE ET DE L'HYDROGENASE	94
2.7. IMPACT DE HPN ET HPN-2 SUR L'EXPRESSION DE L'UREASE	94
2.8. INTERACTIONS DE HPN ET HPN-2 AVEC LES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE TRAFIC DU NICKEL	95
3. DISCUSSION	95
4. MANUSCRIT EN COURS DE SOUMISSION	99
CHAPITRE 2. SYSTEMES COUPLES DE DEAMIDATION ET DE TRANSPORT DE L'ASPARAGINE ET DE LA GLUTAMINE, ESSENTIELS A LA COLONISATION PAR <i>H. PYLORI</i>	153
1. ELEMENTS DE CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	153
2. RESUME DES RESULTATS	154
2.1. SPECIFICITE DE SUBSTRAT ET LOCALISATION CELLULAIRE DE ANSB	154
2.2. TRANSPORT DU GLUTAMATE ET DE L'ASPARTATE	155
2.3. MODULATION FONCTIONNELLE ET TRANSCRIPTIONNELLE DES COUPLES ENZYMES / TRANSPORTEUR γ GT/GLTS ET ANSB/DCUA EN FONCTION DU PH	155

2.4. CARACTERE ESSENTIEL DES SYSTEMES COUPLES D'HYDROLYSE ET DE TRANSPORT DE L'ASPARAGINE ET DE LA GLUTAMINE	156
3. DISCUSSION	156
4. ARTICLE	157
CHAPITRE 3. ETUDE SYSTEMATIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES PROTEINES DU METABOLISME DE L'AMMONIAC	174
1. INTRODUCTION	174
2. MATERIELS ET METHODES	178
3. RESULTATS	181
4. DISCUSSION	186
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	189
CHAPITRE 1. RESEAUX D'INTERACTIONS PROTEIQUES DANS LE METABOLISME DE L'AMMONIAC : REGULATION, OPTIMISATION ET VIRULENCE	190
1. INTRODUCTION	190
2. REGULATION DES COMPLEXES PRODUCTEURS D'AMMONIAC	191
3. LE METABOLISME DE L'ASPARAGINE ET DE LA GLUTAMINE : TOURNE VERS LA VIRULENCE ?	192
4. PERSPECTIVES	194
CHAPITRE 2. DEPENDANCE DE <i>H. PYLORI</i> AU NICKEL : UNE STRATEGIE RISQUEE ET PAYANTE	197
1. <i>HELICOBACTER PYLORI</i> , METALLO-ADAPTE A SA NICHE ?	197
1.1 AVIDE OU FIN GESTIONNAIRE ?	197
1.2 MODELE INTEGRE DU CONTROLE DE L'HOMEOSTASIE DU NICKEL CHEZ <i>H. PYLORI</i>	200
1.3 COMPARAISON AVEC LES MECANISMES DE RESISTANCE AUX METAUX CHEZ LES AUTRES BACTERIES	204
2. PERSPECTIVES	205
CHAPITRE 3. CONCLUSION GENERALE	210
BIBLIOGRAPHIE	212
ANNEXES	229
ARTICLE PUBLIE DANS <i>EUKARYOTIC CELL</i> LE 28 MARS 2008	230

Liste des abréviations

γ GT	Gamma-Glutamyl transpeptidase
ABC	ATP <i>Binding Cassette</i>
ArsRS	<i>Acid Responsive two components System</i>
BabA	<i>Blood Antigen Binding Adhesin</i>
BACTH	<i>Bacterial Two Hybrid</i>
Cag	<i>Cytotoxic Associated Gene</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
C _{ter}	Extrémité carboxy-terminale
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fur	<i>Ferric Uptake Regulator</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Il-	Interleukine-
IPTG	isopropyl- β -D-galactopyranoside
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
LB	Milieu Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry</i>
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
NikR	<i>Nickel Responsive Regulator</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Monoxide d'azote
NOD-like	<i>Nucleotide Oligomerization Domain receptors</i>
N _{ter}	Extrémité amino-terminale
PAMPS	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SabA	<i>Sialic Acid Binding Adhesin</i>
T4SS	Système de Sécrétion de Type IV
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TBDT	<i>TonB Dependant Transporter</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF-	<i>Tumor Necrosis Factor-</i>
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin Protein</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
Y2H	<i>Yeast Two Hybrid</i>

Liste des figures

Figure 1 Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> dans le monde.....	20
Figure 2 Graphiques représentant le parallèle géographique entre la diversité génétique des populations humaines et des isolats de <i>Helicobacter pylori</i>	21
Figure 3 Carte des grands événements migratoires identifiés à partir de l'analyse génétique d'isolats de <i>H. pylori</i> ...	21
Figure 4 Arbre phylogénétique des <i>Helicobacter</i> basé sur l'analyse en <i>Neighbour-joining</i> des séquences d'ARN ribosomique 16S	22
Figure 5 Photographies de <i>Helicobacter pylori</i> en microscopie électronique.....	23
Figure 6 Pathologies associées à l'infection à <i>H. pylori</i>	24
Figure 7 Incidence du cancer gastrique en 2008	25
Figure 8 Réponse immunitaire à <i>H. pylori</i>	31
Figure 9 Structure des flagelles de <i>Helicobacter pylori</i>	34
Figure 10 Modèle de pathogenèse intégrée induite par le T4SS et les adhésines de <i>H. pylori</i>	37
Figure 11 Rôle du T4SS de <i>H. pylori</i> dans l'altération des voies de signalisation cellulaires	38
Figure 12 Maturation de la toxine et mécanismes moléculaires de la pathogenèse induite par VacA.....	41
Figure 13 Complexes protéiques interagissant avec l'uréase	47
Figure 14 Diagramme en hélices du complexe GatCAB de <i>S. aureus</i>	48
Figure 15 Cofacteurs métalliques utilisés dans la catalyse.....	50
Figure 16 Structure moléculaire de l'entérobactine et du ferrichrome.....	51
Figure 17 Mode de fonctionnement du transporteur de sidérophores FecA de <i>E. coli</i>	52
Figure 18 Sites de coordination du nickel	56
Figure 19 Diagramme en hélices de l'uréase de <i>H. pylori</i>	57
Figure 20 Organisation génétique des uréases de <i>K. aerogenes</i> , <i>B. pasteurii</i> et <i>H. pylori</i>	58
Figure 21 Environnements de coordination du nickel dans l'uréase.....	58
Figure 22 Représentation simplifiée du mécanisme catalytique de l'uréase	60
Figure 23 Structure cristalline de la protéine UreE de <i>H. pylori</i>	61
Figure 24 Structure cristalline du complexe UreE/UreG de <i>H. pylori</i>	62
Figure 25 Structure de l'hydrogénase de <i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	64
Figure 26 Diagramme en hélices et positionnement des sites de coordination des métaux de HypA de <i>H. pylori</i> ..	65

Figure 27 Structure des centres [Fe-S]	67
Figure 28 Mécanismes de biosynthèse des centres [Fe-S]	68
Figure 29 Structure du complexe GroES/GroEL et diagramme de GroES avec mise en évidence de l'extension C _{ter} de HspA	74
Figure 30 Alignement des séquences protéiques de Hpn et Hpn-2	75
Figure 31 Structure cristalline de NikR de <i>E. coli</i>	78
Figure 32 Structure dynamique de NikR chez <i>E. coli</i>	79
Figure 33 Localisation des sites de liaison du nickel sur le tétramère NikR de <i>H. pylori</i>	80
Figure 34 Schéma récapitulatif de la régulation hiérarchisée des cibles de NikR chez <i>H. pylori</i>	82
Figure 35 Région répétée de Hpn	91
Figure 36 Alignement des séquences protéiques de Hpn	91
Figure 37 Alignement des séquences protéiques de Hpn-2	92
Figure 38 Modèle présentant un mécanisme d'activation séquentiel de l'uréase dépendant de Hpn et Hpn-2	97
Figure 39 Mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité de la glutamine synthétase chez <i>E. coli</i>	175
Figure 40 Substrats et produits des réactions catalysées par les protéines du métabolisme de l'ammoniac testées	176
Figure 41 Principe du BACTH (Karimova <i>et al</i> , 1998)	178
Figure 42 Interactions positives issues du crible des protéines du métabolisme de l'ammoniac en BACTH	182
Figure 43 Alignement des protéines AspA de <i>H. pylori</i> et de <i>E. coli</i>	183
Figure 44 Quantification de l'activité β -galactosidase des expériences de complémentation fonctionnelle positives	185
Figure 45 Schéma récapitulatif des interactions au sein des protéines testées	186
Figure 46 Résumé des interactions trouvées dans notre étude et mettant en jeu un <i>channeling</i> de l'ammoniac	188
Figure 47 Régulation des complexes producteurs d'ammoniac	192
Figure 48 Mécanisme de pathogenèse dû aux métabolismes de l'asparagine et de la glutamine	193
Figure 49 Modèle d'homéostasie du nickel en conditions de faible concentration en nickel dans le milieu extérieur	201
Figure 50 Modèle d'homéostasie du nickel en conditions non limitantes et pH neutre	202
Figure 51 Mécanisme de contrôle du nickel intracellulaire à pH acide	203

Liste des tableaux

Tableau 1 Liste des adhésines de <i>H. pylori</i> et de leurs récepteurs cellulaires.....	33
Tableau 2 Enzymes utilisant le nickel comme cofacteur métallique et réactions chimiques associées.....	56
Tableau 3 Souches de <i>Helicobacter</i> testées pour établir la phylogénie de Hpn et Hpn-2.....	90
Tableau 4 Oligonucléotides utilisés dans cette étude.....	179
Tableau 5 Plasmides utilisés et construits pour l'étude en BACTH des protéines du métabolisme de l'ammoniac	180

Données bibliographiques

Chapitre I. Généralités sur *Helicobacter pylori*

I. Introduction

La découverte de *Helicobacter pylori* s'apparente à une longue quête où les évidences scientifiques se heurtèrent de tout temps au scepticisme et au dogmatisme. L'ulcère de l'estomac est anatomiquement caractérisé dès le début du 19^{ème} siècle par les publications de Jean Cruveilhier, en France, et de Karl von Rokitanski en Allemagne. Si les descriptions sont conformes à la réalité, les hypothèses pathogéniques sont le reflet des croyances de l'époque, qui perdureront pourtant jusqu'aux années 1980. Les émotions et le système nerveux sont majoritairement mis en cause. Pourtant, dès 1852, le genevois André Duval ouvre la voie d'une compréhension plus précise de l'ulcère. L'inflammation « spécifique et circonscrite qui caractérise l'ulcère signe une pathologie infectieuse dont l'agent causal nous échappe ». La fin du 19^{ème} siècle aurait pu marquer la découverte de *H. pylori* : Walery Jaworski décrit une bactérie spiralée dans des lavages d'estomacs humains. Giulio Bizzozero, pionnier de l'histologie, décrit des bactéries de morphologie similaire dans des coupes d'estomacs de chiens. Hugo Salomon retrouve ces mêmes bactéries dans les estomacs de nombreux mammifères : chat, chien, singe et... homme. L'originalité de cette publication repose sur le fait qu'elle est illustrée d'une planche de microphotographies montrant clairement une bactérie ressemblant à *Helicobacter*. A l'aube du vingtième siècle, l'origine infectieuse de l'ulcère est alors évoquée par Theodor Rosenheim et John C. Hemmeter qui soulignent toutefois la difficulté d'en apporter la démonstration (Teyssou, 2009). Cette hypothèse est tout bonnement oubliée jusqu'en 1983, quand Barry Marshall et Robin Warren publient dans le Lancet leur article rapportant la présence de bactéries spiralées et cultivables vivant dans l'estomac de patients présentant une gastrite chronique, alors que ces bactéries sont absentes chez les patients sains : « *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis* » (Marshall & Warren, 1984). Le scepticisme perdurant toujours dans la communauté médicale, Barry Marshall démontre l'un des postulats de Koch en avalant une suspension pure de la bactérie qu'il a identifiée, alors nommée

Campylobacter pyloridis. Il développe une inflammation gastrique aigue qu'il guérit par la prise d'antibiotiques. En 1989, des études moléculaires distinguent la bactérie de la famille des *Campylobacteraceae* et *Helicobacter pylori* reçoit son nom définitif, au sein d'une nouvelle famille : les *Helicobacteraceae*. Cette bactérie nouvellement identifiée est depuis l'objet de larges études épidémiologiques qui corrélient sa présence à la survenue des pathologies gastriques : gastrite chronique, ulcère gastroduodénal, cancer de l'estomac, lymphomes du MALT (Atherton, 2006). En 1994, le Centre International de Recherche sur le Cancer, dépendant de l'Organisation Mondiale de la Santé, classe *H. pylori* comme la première et toujours unique bactérie agent carcinogène de classe I (International Agency for Research on Cancer, 1994). Les travaux de Barry Marshall et Robbin Warren ont révolutionné la compréhension des pathologies gastriques, qui restent à ce jour un problème majeur de santé publique. En récompense, le Prix Nobel de Médecine et Physiologie leur a été attribué en 2005.

L'infection à *H. pylori* est largement répandue à la surface du globe et sa prévalence varie en fonction des zones géographiques et des populations établies dans une même zone. De manière générale, il existe une corrélation inverse entre le niveau de développement socioéconomique du pays et le taux d'infection de la population ; la prévalence de l'infection à l'âge adulte dépasse les 80% dans les pays en développement, alors qu'elle n'est que de 20 à 50% dans les pays industrialisés (Figure 1)(Suerbaum & Michetti, 2002).

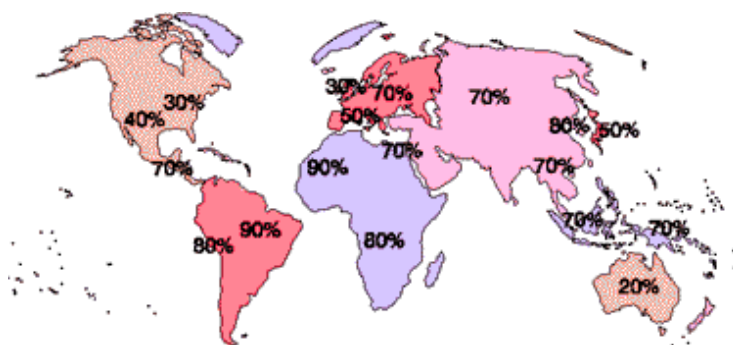


Figure 1 Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* dans le monde

Les pourcentages indiquent la prévalence de l'infection en fonction de la zone géographique considérée. Carte issue de *The Helicobacter Foundation* (www.helico.com).

L'infection se propage de manière non épidémique, et l'acquisition de la bactérie se fait majoritairement durant la prime enfance, par transmission intra familiale (Nguyen *et al*, 2006). La seule voie d'infection connue est orale, par ingestion de la bactérie. L'infection peut avoir lieu au travers des vomissures, de la salive, de la plaque dentaire et des fèces issues d'un transit intestinal rapide provenant d'un sujet infecté. Ces voies sont majoritaires dans les pays industrialisés, alors que des études sujettes à polémiques ont rapporté que la contamination

pouvait aussi survenir par l'eau de boisson dans les pays en voie de développement (Parsonnet *et al*, 1999; Brown, 2000).

Longtemps insoupçonnée, l'histoire commune de *H. pylori* avec l'homme n'en demeure pas moins ancienne. Les études phylogénétiques, menées à partir d'isolats de *H. pylori* provenant d'origines géographiques éloignées, ont permis de dater l'apparition de la bactérie il y a environ 58 000 ans. Au cours du portage, la bactérie a évolué conjointement à son hôte, notamment grâce à sa grande variabilité génétique (point qui sera développé dans le paragraphe 2). Plus on s'éloigne de l'Afrique de l'Est, berceau de l'humanité, plus la distance génétique entre les souches augmente (Figure 2), permettant de signer les grandes migrations humaines et l'établissement de foyers de peuplement stabilisés et dans lesquels circulent des populations relativement homogènes de *H. pylori* (Figure 3) (Linz *et al*, 2007; Falush *et al*, 2003).

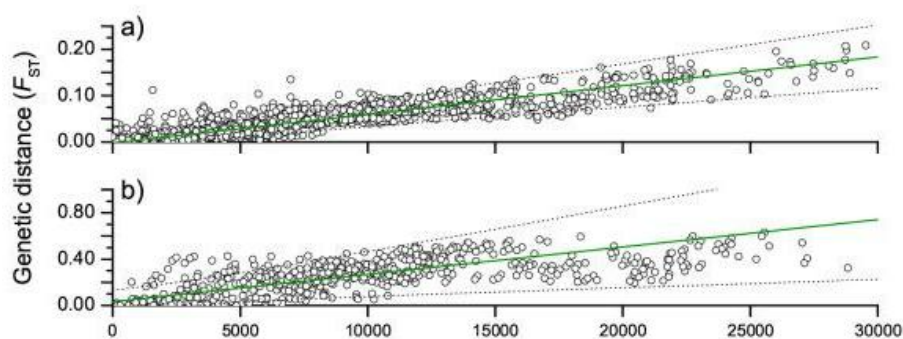


Figure 2 Graphiques représentant le parallèle géographique entre la diversité génétique des populations humaines et des isolats de *Helicobacter pylori*

Distance génétique (F_{ST}) entre paires de populations humaines (a) et de *Helicobacter pylori* (b) en prenant comme point géographique zéro l'Afrique de l'Est. Figure issue de (Linz *et al*, 2007).

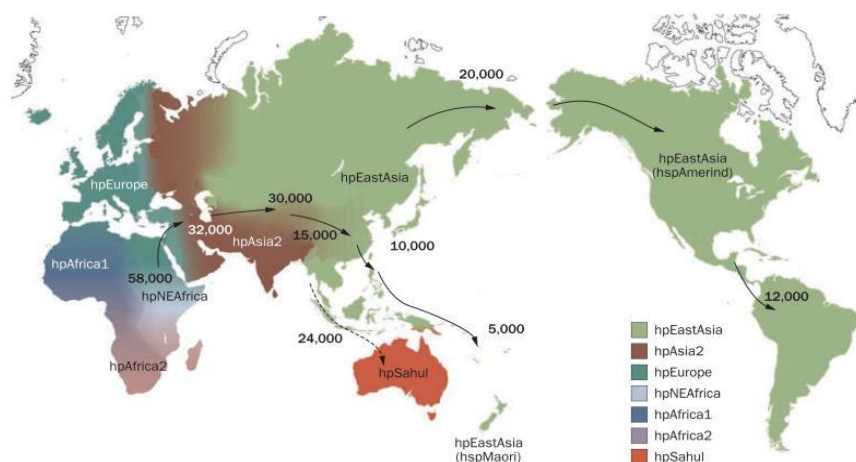


Figure 3 Carte des grands événements migratoires identifiés à partir de l'analyse génétique d'isolats de *H. pylori*

Les flèches indiquent les migrations humaines spécifiques, le nombre indique le nombre d'années depuis l'événement. La légende colorée indique le sous-type génétique de *H. pylori* actuellement retrouvé dans les différentes régions. Figure issue de (Yamaoka, 2010).

Après la découverte de *H. pylori*, cette bactérie est devenue le chef de file du genre *Helicobacter* qui compte 31 espèces à ce jour. Ce genre peut être divisé en deux groupes en fonction de leur tropisme : les *Helicobacter* entérohépatiques, colonisant le foie et les intestins, et les *Helicobacter* gastriques colonisant l'estomac. Les *Helicobacter* colonisent une large variété d'animaux à sang chaud, principalement les mammifères – furets, rongeurs, homme – et quelques oiseaux (Figure 4).

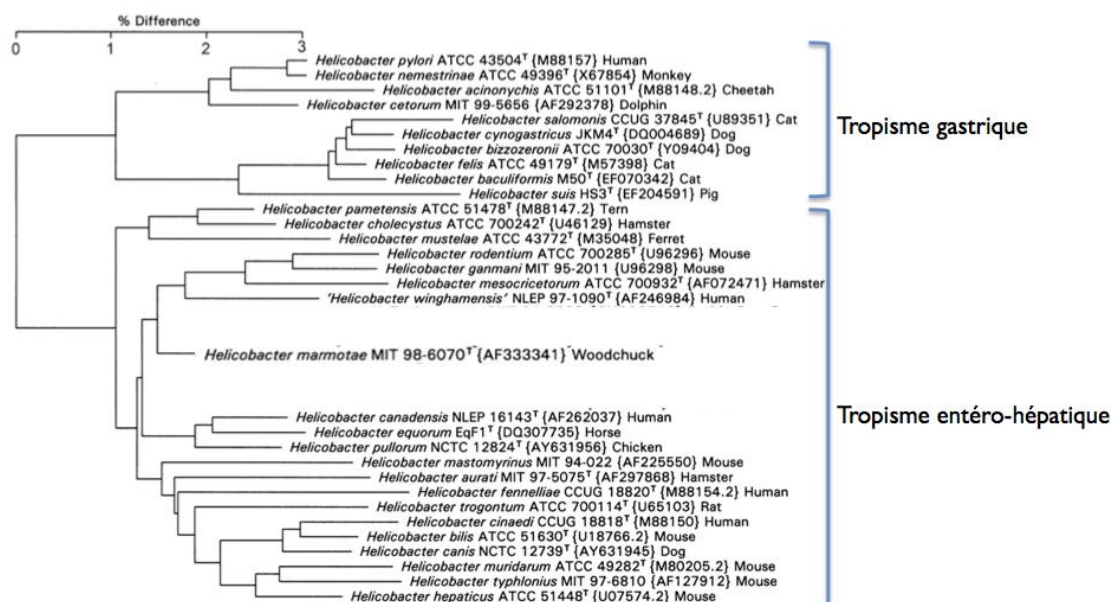


Figure 4 Arbre phylogénétique des *Helicobacter* basé sur l'analyse en Neighbour-joining des séquences d'ARN ribosomique 16S

La longueur des barres représente le pourcentage de différence entre les souches. Les numéros d'accès des séquences sur GenBank sont indiqués entre parenthèses tandis que l'hôte naturel est indiqué en fin de ligne. Figure adaptée de (Beisele *et al*, 2011).

Ces *Helicobacter* non *pylori* possèdent de nombreux facteurs de virulence et leur rôle étiologique dans certaines pathologies gastriques ou hépatiques de l'animal a déjà été démontré. Bien que le spectre d'hôte de chaque espèce soit restreint, des cas d'identification de *Helicobacter* non *pylori* ont été rapportés à partir de prélèvements de patients, parfois porteurs asymptomatiques, plus rarement après avoir développé une pathologie sévère. C'est par exemple le cas de *H. suis*, *H. bizzozeronii* et *H. heilmannii* qui peuvent provoquer des gastrites (Haesebrouck *et al*, 2011; Smet *et al*, 2011). De manière générale, le rôle pathogénique des *Helicobacter* non *pylori* chez l'homme est de plus en plus reconnu, et leur association avec les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les pathologies hépatiques est aujourd'hui un champ de recherche en expansion (Fox, 2002; Smet *et al*, 2011).

De manière surprenante, des études ont démontré une corrélation inverse entre la présence de *H. pylori* dans l'estomac et les pathologies de l'œsophage comme le reflux

gastrique et l'œsophage de Barrett. Il est proposé que la colonisation par *H. pylori* diminue la sécrétion acide de l'estomac et ainsi, lors des épisodes de reflux, l'œsophage serait moins attaqué. La corrélation inverse entre prévalence de *H. pylori* chez les enfants et le développement d'un asthme ou de pathologies allergiques au sens large a aussi été observée. Il est proposé que l'infection à *H. pylori* mobilise les lymphocytes T au niveau de la muqueuse gastrique, y compris les lymphocytes T régulateurs, et que ceux-ci pourraient exercer un effet suppresseur sur les lymphocytes présents à d'autres sites, comme les poumons (Cover & Blaser, 2009; Arnold *et al*, 2011).

Alors qu'au cours de l'évolution l'Homme n'a jamais éradiqué *H. pylori*, on peut s'interroger sur le statut de cette bactérie : symbionte, commensal, parasite, ou strictement pathogène (Reibman *et al*, 2008; Carroll *et al*, 2004; Sachs & Scott, 2012) ?

2. Caractéristiques générales de l'infection

2.1. Description de la bactérie

H. pylori est une bactérie à coloration de Gram négative, non sporulante, microaérophile, appartenant à la classe des ϵ -*Proteobacteria*. De morphologie spiralée, *H. pylori* mesure environ 4 μm de long pour 0,5 μm de large. Une forme coccoïde, non cultivable, est aussi décrite : apparaissant après un stress aux antibiotiques ou après plusieurs dizaines d'heures en culture non renouvelée, elle pourrait constituer une forme résistante à l'intérieur de l'hôte (Nilius *et al*, 1993). *H. pylori* est mobile grâce à des flagelles (de 2 à 6) polaires et engainés qui lui confèrent une grande capacité de déplacement dans les substances visqueuses comme le mucus gastrique (Figure 5) (Yoshiyama *et al*, 1999).



Figure 5 Photographies de *Helicobacter pylori* en microscopie électronique

Microphotographies en fausses couleurs de *H. pylori*. (A), Microscopie électronique à transmission. Pierre Gounon, Institut Pasteur, 1995. (B), Souche spiralée et (C), coccoïde en microscopie électronique à balayage. Clichés réalisés par Christine Schmitt et Meriem El-Ghachi. Colorisation par Jean-Marc Panaud. Institut Pasteur, 2011

Le premier génome de *H. pylori*, celui de la souche 26695, a été séquencé en 1997. Il comprend 1,7 Mbp avec un GC% relativement faible de 39% (Tomb *et al*, 1997). A l'heure

actuelle, les génomes de 38 souches différentes de *H. pylori* ont été séquencés. Les études de variabilité ont démontré que les différentes souches possèdent une hétérogénéité génétique importante. Cette variabilité est due à deux facteurs : un taux de mutations spontanées élevé, et une compétence naturelle alliée à une grande capacité de transformation, rendant aisée l'intégration d'ADN exogène par recombinaison homologe. Cette grande plasticité génomique confère à *H. pylori* des facultés d'adaptation importantes, par une évolution associée à des multi-infections ou par dérives génétiques dans l'hôte (Blaser, 2012).

2.2. Maladies associées à l'infection à *H. pylori*

L'infection à *H. pylori* induit en premier lieu une inflammation intense de l'antré et du corps de l'estomac : c'est la gastrite aiguë. Réaction de défense de l'organisme vis-à-vis de l'infection, la gastrite aiguë se caractérise par une infiltration leucocytaire de la muqueuse gastrique et une diminution de la sécrétion d'acide chlorhydrique par les cellules pariétales. Malgré la forte réponse immunitaire, les neutrophiles et les cellules mononucléaires présentes échouent à éradiquer l'infection et *H. pylori* établit en général une colonisation persistante.

Une fois la colonisation de l'estomac par *H. pylori* installée, l'inflammation demeure permanente et la gastrite chronique s'installe, toute la vie en l'absence de traitement. En fonction de la réponse de l'hôte, la sécrétion acide de l'estomac peut augmenter ou diminuer. En fonction de cela, l'évolution de l'infection suivra différents scénarios.

Quatre-vingt pourcent des porteurs de *H. pylori* restent asymptomatiques. Les autres peuvent développer les pathologies associées à l'infection avec une probabilité proportionnelle à leur âge (Figure 6).

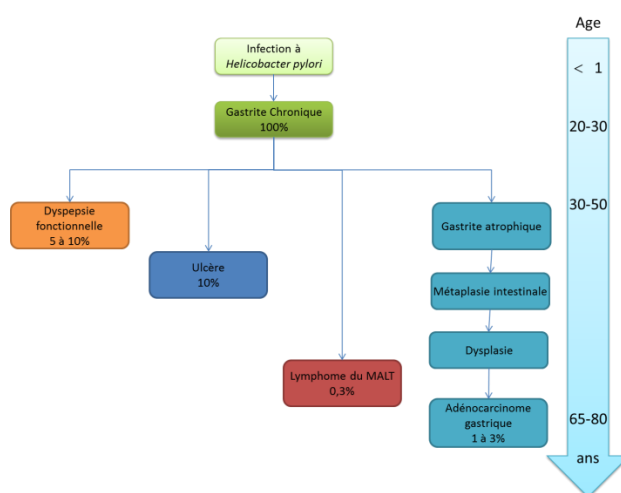


Figure 6 Pathologies associées à l'infection à *H. pylori*

Les pourcentages indiquent la proportion de personnes porteuses de *H. pylori* développant une pathologie. L'âge moyen de survenue des pathologies est indiqué sur la droite de la figure.

Si la sécrétion acide de l'estomac augmente, *H. pylori* reste cantonnée dans la région de l'antrum qui, en réponse s'inflamme : c'est la gastrite antrale. Du fait de la sécrétion acide anormalement haute, le duodénum est exposé à une charge acide importante et subit une inflammation importante qui souvent évoluera vers un ulcère duodénal.

Au contraire, si la sécrétion acide de l'estomac baisse, *H. pylori* colonisera tout l'estomac, entraînant une inflammation de l'antrum et du corps : c'est la pangastrite. L'estomac lui-même devient alors le siège d'une ulcération gastrique. Sous l'effet de l'inflammation, l'architecture de l'estomac est alors fortement modifiée et présente dans certains cas des atrophies. L'inflammation continue conduira potentiellement à l'installation d'une métaplasie de type intestinal.

La métaplasie est la première étape d'une succession d'événements qui peuvent mener au développement d'un cancer gastrique (Kusters *et al*, 2006). La métaplasie est considérée comme le point de non-retour à partir duquel les lésions ne régressent plus d'elles-mêmes après l'éradication de *H. pylori*. La métaplasie de l'estomac peut évoluer en dysplasie, puis en adénocarcinome gastrique. Le cancer gastrique est le quatrième cancer le plus fréquent dans le monde, derrière celui du poumon, du sein, et du colon (Figure 7). Cependant, la mortalité associée à cette pathologie en fait la deuxième cause de mort par cancer. En 2008, on a compté 988 000 nouveaux cas de cancer gastrique pour 736 000 décès dus à cette maladie (International Agency for Research on Cancer, 2008).

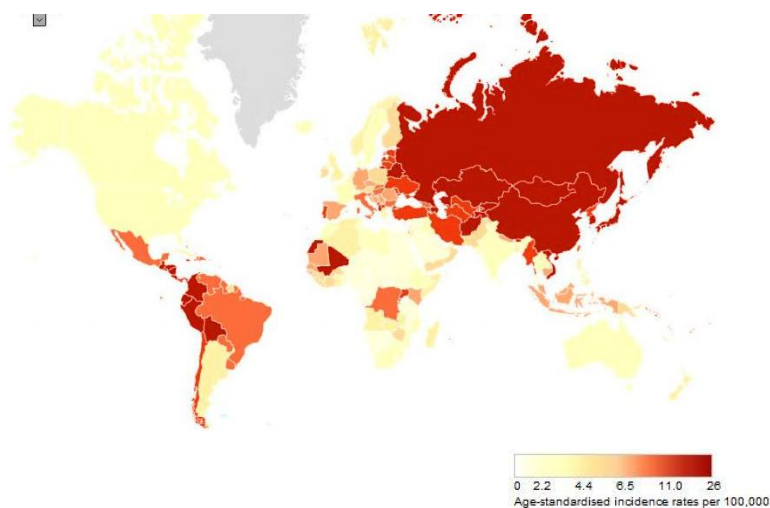


Figure 7 Incidence du cancer gastrique en 2008

Incidence du cancer gastrique chez l'homme, standardisée par rapport à l'âge. Nombre de nouveaux cas pour 100 000 habitants. La même répartition géographique est retrouvée chez la femme. Carte issue de (International Agency for Research on Cancer, 2008).

H. pylori est également associé à un autre syndrome prolifératif : le lymphome du MALT. Dans de rares cas, la muqueuse gastrique est infiltrée par des lymphocytes B qui vont s'y multiplier (Kusters *et al*, 2006).

La haute prévalence de l'infection et la mortalité due aux pathologies gastriques, notamment dans les pays en développement, en font un organisme pathogène d'importance majeur en terme de santé publique.

2.3. Traitement de l'infection

Les traitements conduisant à l'éradication de *H. pylori* permettent de guérir les gastrites chroniques et les ulcères même si le sujet est infecté depuis plusieurs dizaines d'années. Dans le cas du cancer de l'estomac, si le traitement est réalisé dans les étapes précoces de la cancérogenèse, au stade de la gastrite atrophique, le bénéfice pour le patient est notable et les lésions peuvent même régresser. Dans le cas des lymphomes du MALT, l'éradication de *H. pylori* conduit à près de 80% de taux de guérison, même en l'absence de traitement par des molécules antiprolifératives (Cavanna *et al*, 2008). Dans le cas de pathologies gastriques déclarées, il existe donc un bénéfice certain à traiter l'infection à *H. pylori* quand elle a été diagnostiquée.

Le traitement de première intention, tel qu'il est recommandé par la conférence de consensus de Maastricht 4 repose sur une trithérapie de 7 à 14 jours associant un inhibiteur de pompe à protons et deux antibiotiques, clarithromycine ou métronidazole et amoxicilline. L'inhibiteur de pompe à protons permet d'augmenter le pH de l'estomac et d'optimiser l'action des antibiotiques. Cependant, les résistances croissantes à la clarithromycine (26% des souches françaises en 2010) et au métronidazole (61%), conduisent à de nombreux échecs thérapeutiques (Raymond *et al*, 2010; Malfertheiner *et al*, 2012). En France, face aux résistances croissantes, le traitement séquentiel associant sur 10 jours la prise d'un inhibiteur de pompe à protons avec de l'amoxicilline, de la clarithromycine et un imidazolé doit être privilégié en première intention (Zullo *et al*, 2007; Vaira *et al*, 2007). Ce traitement consiste en la prise conjointe de l'inhibiteur à protons et d'amoxicilline pendant les 5 premiers jours, puis une trithérapie classique pendant le reste du traitement. Ce traitement permet un taux d'éradication de près 90%, contre 77% pour le traitement classique (Gisbert & Calvet, 2012).

Longtemps commercialisé dans de nombreux pays et utilisé de manière empirique pour traiter les pathologies digestives, le bismuth a récemment bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché en France pour une quadrithérapie bismuthée (Pylera®) associant citrate de bismuth, tétracycline, métronidazole et inhibiteur de pompe à protons. Ce traitement permet

d'atteindre un taux de succès de 97% dans l'éradication de *H. pylori*, et ce, indépendamment des résistances au métronidazole (Saleem *et al*, 2009; Malfertheiner *et al*, 2012).

Alors que les bénéfices de l'éradication de *H. pylori* sont avérés, l'accès au dépistage et aux traitements adaptés dans les zones de forte endémie reste un défi à relever. Parallèlement, la découverte de nouvelles molécules antibiotiques contre *H. pylori* est cruciale, afin d'anticiper la propagation de souches résistantes aux molécules antibiotiques conventionnelles, qui sont en constante augmentation.

3. Facteurs impliqués dans la pathogenèse induite par l'infection

Le risque de développer les pathologies associées à l'infection à *H. pylori* est déterminé par trois paramètres : le mode de vie, les facteurs de prédisposition de l'hôte et les caractéristiques de virulence de la souche infectante. Ces trois éléments influencent la survenue des dommages sur la muqueuse et l'issue clinique des pathologies gastriques.

3.1. Déterminants de l'hôte

3.1.1. Déterminants environnementaux et mode de vie

La survenue des pathologies gastriques sévères, ulcères et cancers, a pu être corrélée à des modes de vie qui apparaissent comme un facteur de risque. Les études reliant les habitudes de vie avec l'incidence de survenue du cancer gastrique sont nombreuses et un consensus semble se dégager quant aux cofacteurs environnementaux associés à une plus forte incidence.

Il a été démontré que les cancers gastriques étaient plus nombreux chez les hommes âgés de plus de 60 ans infectés par *H. pylori*. Par ailleurs, l'âge et la durée d'infection sont à eux seuls un facteur de risque puisque les cancers sont presque systématiquement déclarés chez des patients de plus de 40 ans. Cet effet entre en synergie avec le tabagisme, qu'il soit présent ou passé. La consommation d'alcool régulière, un régime riche en sel et en nitrates ont aussi été identifiés comme des facteurs de risque pour les pathologies gastriques sévères. Enfin, concernant les caractéristiques métaboliques de l'hôte, des études ont démontré le rôle aggravant d'un taux plasmatique de pepsinogène I faible ($\leq 70 \text{ ng.mL}^{-1}$) associé à un ratio $[\text{pepsinogène I}]/[\text{pepsinogène II}] \leq 3$. En effet, dans ces conditions, l'atrophie gastrique est plus prononcée. Enfin, bien qu'évoquée, la corrélation entre indice de masse corporel élevé et développement du cancer gastrique est aujourd'hui contestée ; il semble que ce paramètre soit

plus le reflet des *mauvaises* habitudes de vie des patients qu'un véritable facteur de risque indépendant (Yamaji *et al*, 2009).

Pour conclure, il a été démontré, comme pour de nombreux cancers, que la consommation d'antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, les polyphénols et les caroténoïdes avait un effet protecteur sur le développement des pathologies gastriques. Ces effets sont le corollaire de la malabsorption de la vitamine B12 et des folates causée par l'infection. Cette malabsorption entraîne une diminution de la concentration en glutathion dans le corps et une augmentation de la peroxydation des lipides, exposant le corps à un stress oxydant plus important (Izzotti *et al*, 2009).

3.1.2. Polymorphismes génétiques

De nombreuses études ont cherché à déterminer des marqueurs génétiques de prédisposition aux pathologies gastriques sévères. Ces études ont principalement démontré des susceptibilités dues à des polymorphismes dans les gènes intervenant dans la réponse immunitaire, le stress oxydatif et les mécanismes de réparation de l'ADN.

Il a été montré que l'infection à *H. pylori* est responsable d'une inflammation chronique associée à une augmentation de la concentration des espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites par les cellules immunitaires. L'ADN de l'hôte est sujet à des attaques par ces ROS. C'est pourquoi des polymorphismes entraînant une sous-expression des gènes codant les protéines de réparation des dommages aux acides nucléiques sont un facteur aggravant de développement des pathologies gastriques puisque les mutations vont s'accumuler dans les cellules gastriques. De plus, ces polymorphismes sont synergisés par l'infection puisque *H. pylori* engendre une diminution de l'expression des gènes de réparation de l'ADN (Machado *et al*, 2009; Touati, 2010).

Un polymorphisme dans des gènes codant des enzymes métaboliques a été trouvé comme favorisant les pathologies gastriques. C'est le cas du variant CYP2E1 codant pour une version du cytochrome P450, défectueux dans sa fonction de détoxification des nitrosamines provoqués par l'activation chronique de macrophages lors de l'infection. C'est aussi le cas de l'allèle GSTM1 codant pour la glutathion-S-transférase, enzyme responsable de la détoxification des radicaux oxygénés (Palli *et al*, 2005; Izzotti *et al*, 2007).

Le polymorphisme de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire est associé à des pathologies plus sévères. Dans les populations caucasiennes, c'est notamment le cas pour les gènes codant les cytokines pro-inflammatoires. Il a été montré qu'un polymorphisme entraînant une surexpression de l'IL-1 β , accroît l'inflammation de la

muqueuse en réponse à l'infection à *H. pylori* et conduit à une hypochlorhydrie accrue. Cette inflammation, conjointement à la diminution de la sécrétion acide augmente l'atrophie des glandes gastriques et donc, le risque de développer une métaplasie (El-Omar *et al*, 2001). Aussi, les polymorphismes génétiques dans le gène *tnfa*, conduisant à la surexpression du TNF- α sont associés à un risque de cancer gastrique accru. Le même cas de figure est valable pour l'IL-8, dont la sécrétion est de plus influencée par les caractéristiques intrinsèques de *H. pylori* (Izzotti *et al*, 2009).

3.1.3. La réponse immunitaire à *H. pylori*

L'infection à *H. pylori* induit une réponse immunitaire muqueuse et systémique importante, associée à la production d'anticorps (Perez-Perez *et al*, 1988). Cependant, ni la réponse humorale, ni la réponse oxydative ne parviennent à endiguer l'infection. En revanche, l'inflammation intense est responsable de dommages à la paroi gastrique qui peuvent mener à la gastrite atrophique. Nous avons déjà évoqué le rôle de l'inflammation dans le développement des pathologies gastriques.

H. pylori s'infiltré rarement, si ce n'est jamais, dans la muqueuse gastrique. *H. pylori* peut coloniser les cryptes de l'estomac, mais ne va jamais disséminer. La réponse de l'hôte est principalement déclenchée par la fixation des bactéries aux cellules épithéliales. *H. pylori* peut lier le CMH de classe II présent à la surface de cellules épithéliales gastriques, induisant leur apoptose (Fan *et al*, 2000).

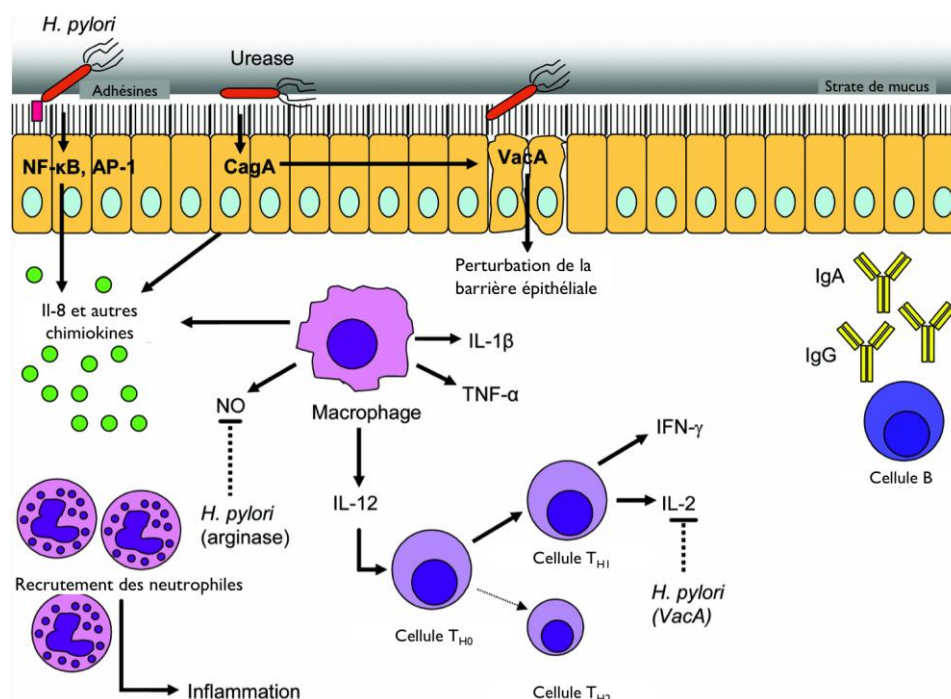
Les cellules de l'immunité innée reconnaissent les bactéries pathogènes au travers de motifs conservés dénommés PAMPS : LPS, flagelline, peptidoglycane, ADN méthylé. Ces PAMPS sont reconnus grâce aux récepteurs membranaires TLR, ou aux récepteurs cytosoliques NOD-like.

H. pylori est majoritairement reconnu par le TLR-2 (reconnaissant des lipoprotéines, le peptidoglycane des Gram +, les acides lipotéichoïques) et le TLR-9 (reconnaissant les îlots CpG méthylés) alors que la plupart des autres bactéries à Gram négatif le sont *via* leur LPS par le TLR-4. Le LPS de *H. pylori* possède un lipide A dont la structure est faiblement immunogène. De plus, le LPS de *H. pylori* mime des motifs des antigènes Lewis de l'hôte. Il a été montré que le LPS de *H. pylori* est 500 fois moins immunogène que celui de *Salmonella typhimurium* et de *Escherichia coli* (Muotiala *et al*, 1992). La reconnaissance de *H. pylori* par le TLR-2 provoque une réponse anti-inflammatoire alors qu'une reconnaissance par le TLR-4 aurait provoqué une inflammation intense (Sayi *et al*, 2011). L'inflammation importante rencontrée dans l'estomac est donc plutôt le fait de la reconnaissance de la bactérie au travers de fragments du peptidoglycane dont l'injection dans la cellule hôte est dépendante du T4SS de *H. pylori* et qui

sont reconnus par NOD-1. Il y a alors activation de la voie du NF- κ B et induction des gènes de l'immunité innée, une inflammation locale intense due à la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-8, et une production de peptides antimicrobiens (Viala *et al*, 2004; Grubman *et al*, 2010; Müller & Solnick, 2011). Durant cette première phase de réponse du système immunitaire, les macrophages et les neutrophiles présents dans la muqueuse gastrique sont stimulés par l'IL-8, l'IL-6 et l'IL-1 β ; il y a formation de H₂O₂ et de NO, responsables d'un stress oxydatif et nitrogéné intense.

Cependant, la réponse immunitaire est potentiellement insuffisante pour éradiquer l'infection. En effet, une étude menée chez des souris KO pour l'IL-10 (une cytokine anti-inflammatoire) a démontré que le système immunitaire inné est capable d'endiguer l'infection par *H. pylori* (Chen *et al*, 2001). C'est donc plutôt la modulation du système immunitaire par *H. pylori* qui est responsable de la persistance de cette infection au long cours. La réponse immunitaire à *H. pylori* impliquant un équilibre entre acteurs de l'immunité innée, et une réponse adaptative T_{H1} et T_{H17} dépendante influence largement l'issue de l'infection.

Les lymphocytes T *helper* (T_H) constituent des sous-ensembles de lymphocytes dont le profil d'expression des cytokines est spécifique au sous-ensemble considéré. La réponse T_{H1} est prédominante lors de l'infection à *H. pylori*. Elle se caractérise par la production d'IFN- γ et d'IL-12. L'IL-12 est une cytokine qui entretient la réponse T_{H1} et stimule les cellules NK. L'IFN- γ , produit par les cellules T_{H1} et NK conduit à l'activation de la production de NO, accroît l'activité des cellules NK et stimule l'activité lysosomale des macrophages (Figure 8). Alors que *H. pylori* n'est pas un pathogène invasif, et qu'il induit une réponse humorale importante, cette réponse T_{H1} est surprenante car généralement réservée aux pathogènes intracellulaires. La réponse T_{H1} est entretenue entre autres par la protéine HP-NAP et permet localement la survie à long terme de monocytes activés et de neutrophiles impliqués dans la progression de la gastrite (Cappon *et al*, 2010; D'Elios *et al*, 2007). Les lymphocytes T_{H2} synthétisent quant à eux les IL-4, IL-5 et IL-10, qui sont des cytokines suppressives de la réponse T_{H1}. Une réponse T_{H2} à l'infection existe, déclenchée par la reconnaissance du pathogène par les cellules dendritiques et la production de *Thymic Stromal Lymphopoietin Protein* (TSLP) par les cellules épithéliales (Kido *et al*, 2010). Il a été montré qu'une réponse T_{H2} forte était bénéfique à la muqueuse gastrique (Smythies *et al*, 2000).

Figure 8 Réponse immunitaire à *H. pylori*

L'adhérence de *H. pylori* aux cellules gastriques et l'injection d'effecteurs bactériens dans la cellule hôte induit la synthèse d'IL-8 et d'autres chimiokines, ayant pour effet d'activer les réponses innées et adaptatives. Les effecteurs bactériens indiqués sur cette figure seront définis au paragraphe 3. Figure adaptée de (Portal-Celhay & Perez-Perez, 2006).

Nous verrons plus loin que *H. pylori* utilise plusieurs stratégies d'immunomodulation. D'autre part, l'hôte doit se prémunir d'une inflammation trop intense dont on a vu qu'elle est délétère pour la muqueuse gastrique, tout en permettant un contrôle de l'infection. Quant à *H. pylori*, sa faculté à promouvoir une réponse anti-inflammatoire afin d'éviter d'être éradiquée par son hôte est la clé d'une infection établie pour des décennies en l'absence de traitement. Tout est donc question d'équilibre et c'est lorsque l'une des réponses devient prédominante que la coexistence *relativement pacifique* entre *H. pylori* et son hôte est rompue.

3.2. Déterminants bactériens

3.2.1. Facteurs d'adhérence

Bien qu'une majorité de la population de *H. pylori* se multiplie dans le mucus gastrique qui recouvre la surface de l'estomac, environ 20% des bactéries adhèrent à l'épithélium gastrique. Cette adhérence est le fait des adhésines, des protéines de surface, conjuguées à des sucres ou des lipides. Certaines adhésines de *H. pylori* sont capables de lier les antigènes de groupe sanguin Lewis, exprimés à la surface de l'épithélium gastrique. Des études ont montré qu'une expression accrue des antigènes Lewis dans l'estomac est associée à une population plus importante de bactéries adhérant à l'épithélium (Sheu *et al*, 2003).

Les souches de *H. pylori* qui codent pour une adhésine BabA active sont capables de lier l'antigène Lewis b des cellules de l'hôte (Tableau I) (Ilver *et al*, 1998). Ces souches sont associées à une fréquence plus élevée de survenue d'ulcères, de lésions précancéreuses, et promeuvent l'inflammation et la prolifération épithéliales (Yu *et al*, 2002; Guruge *et al*, 1998).

H. pylori est aussi capable de lier l'antigène Lewis x grâce à son adhésine SabA, liant les acides sialiques (Tableau I). Grâce à cette protéine, *H. pylori* peut aussi établir des contacts avec des mucines présentes dans le mucus, et dont le schéma de glycosylation est influencé par le stade des lésions gastriques. Ces mucines peuvent de plus stimuler la prolifération de *H. pylori* (Skoog *et al*, 2012).

Les protéines AlpA et AlpB confèrent à *H. pylori* la possibilité de lier les laminines. Les laminines sont des glycoprotéines, qui, avec le collagène, sont les constituants majoritaires de la *lamina propria*. Ces protéines sont sécrétées par les cellules épithéliales, les cellules conjonctives et les cellules du chorion et s'assemblent en un réseau maillé dense constituant la matrice extracellulaire. Dans le modèle gerbille de colonisation, des souches de *H. pylori* déficientes pour AlpA et AlpB provoquent une inflammation plus faible par rapport à une souche sauvage (Senkovich *et al*, 2011).

D'autres protéines montrées comme étant des facteurs d'adhérence de la bactérie à l'épithélium gastrique sont présentées dans le Tableau I.

Adhésine	Récepteur cellulaire
HopZ	Inconnu
HpaA	
Nap	
SabA	Acides sialiques
64 kDa	Mucines
62 kDa	
56 kDa	
20 kDa	
Hsp60	Sulfatides
Hsp70	
LPS	Récepteur de 97-kDa aux mucines
AlpA	
AlpB	Laminine
Noyau du LPS	
25 kDa	
BabA	Lewis b
Antigène O	
Nap	Lewis x
SabA	
Nap	Mucines
61 kDa	Antigène O, Lewis b, Lewis a
Exoenzyme-S-like	Heparan sulfate et autres polysaccharides
Catalase	sulfatés
Nap	Glycolipides

Adhésine	Récepteur cellulaire
Inconnu	CMH de classe II
Inconnu	Intégrines $\beta 1$

Tableau I Liste des adhésines de *H. pylori* et de leurs récepteurs cellulaires

Protéines de *H. pylori* capables de se lier à la cellule eucaryote ou adhésines dont on a identifié au moins un récepteur cellulaire. *Tableau* adapté de (Testerman *et al*, 2001).

Enfin, il est important de souligner que les gènes d'adhésines de *H. pylori* possèdent une diversité génétique importante. Cette variabilité permet une adaptation des propriétés d'adhérence, et facilite la persistance de l'infection. Cette adaptation a lieu au travers de mécanismes de conversion génétique, de variation de phase et de recombinaison intragénétique entre gènes homologues (Bäckström *et al*, 2004; Talarico *et al*, 2012). Les gènes des adhésines sont selon les événements génétiques soit exprimés, soit réprimés, et ils modulent ainsi les propriétés d'adhérence des souches de *H. pylori*.

3.2.2. Importance de la mobilité

La mobilité conférée à *H. pylori* par ses flagelles est indispensable à la colonisation de l'hôte par deux paramètres : la migration de la lumière de l'estomac, extrêmement acide, vers l'épithélium gastrique, et la capacité à se déplacer dans le mucus visqueux qui tapisse la paroi de l'estomac. Des mutants de MotB, protéine impliquée dans la rotation du flagelle, ont une capacité de colonisation réduite, tandis que les gènes codant pour les protéines de structure ou d'assemblage du flagelle sont indispensables à la colonisation (Kavermann *et al*, 2003; Ottemann & Lowenthal, 2002).

L'expression des gènes du flagelle est contrôlée de manière hiérarchique et permet la production des protéines flagellaires par étapes, de façon à ce que leur intégration dans la néo-structure soit facilitée et coordonnée (Figure 9).

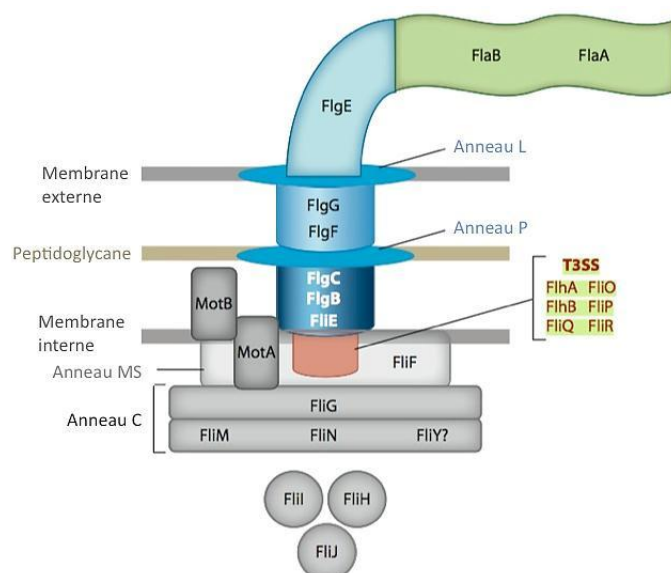


Figure 9 Structure des flagelles de *Helicobacter pylori*

La couleur grise indique les protéines du moteur. Bleu : corps basal. Vert : filament flagellaire
T3SS, système de sécrétion de type III. Figure adaptée de (Lertsethtakarn *et al*, 2011).

Les flagelles de *H. pylori* sont entourés d'une gaine protectrice qui est une continuité de la membrane externe (Goodwin *et al*, 1985). Bien que les mécanismes de synthèse et le rôle de cette gaine soient encore non-élucidés, elle pourrait être impliquée dans l'échappement de *H. pylori* au système immunitaire, en dissimulant la flagelline aux récepteurs de l'immunité innée ou aux anticorps (Kostrzynska *et al*, 1991).

H. pylori, lorsqu'il pénètre dans l'estomac, est exposé à un pH extrêmement acide (pH médian 2 ~ 3) et se déplace vers le mucus gastrique, dont le pH est plus clément. En effet, le mucus constitue un environnement anisotrope, résultat de l'exposition à l'acidité du lumen (acidifié par l'acide chlorhydrique) sur sa face externe, alors que le mucus néosynthétisé, côté paroi gastrique, est neutre. Il s'établit donc un gradient de pH compris entre 3 et 7 dans lequel on considère que la prolifération bactérienne a lieu.

Le chimiotactisme est un mécanisme qui permet aux bactéries de se diriger, de façon orientée, selon un gradient de molécules attractives ou répulsives, ou de pH. Les mécanismes moléculaires du chimiotactisme ne seront pas développés ici. Pour une revue, voir (Porter *et al*, 2011). Pour s'orienter, *H. pylori* ne suit pas un gradient de molécule attractive, bicarbonate ou urée, mais plutôt un gradient de pH de acide vers neutre (Schreiber *et al*, 2004). Cependant, le chimiotactisme ne semble jouer qu'un rôle secondaire dans l'établissement de l'infection. En effet, des mutants affectés dans le chimiotactisme sont toujours capables d'établir une infection chez la souris, avec cependant une dose infectieuse 250 fois plus importante. Ces mutants

perdraient uniquement leur capacité à coloniser tout le mucus de l'estomac murin, développant un tropisme particulier pour le corps (Terry *et al*, 2005; Rolig *et al*, 2012).

Bien que non indispensable, le chimiotactisme, allié à la grande mobilité de *H. pylori*, confère à cette bactérie des capacités d'adaptation à sa niche écologique indispensables à l'établissement d'une infection pérenne. La mobilité semble même être déterminante pendant l'infection installée puisque des isolats bactériens juste extraits de porcelets sont plus mobiles que les souches cultivées sur boîtes de Pétri (Eaton *et al*, 1989).

3.2.3. Facteurs de virulence et de colonisation

H. pylori possède un panel important et sophistiqué de facteurs de virulence et d'effecteurs qui sont associés à la capacité de la bactérie à coloniser et à survivre dans son hôte, mais aussi à endommager la muqueuse gastrique. Nous avons déjà évoqué les adhésines ainsi que les flagelles qui concourent à la colonisation et à l'inflammation. Dans cette partie, nous nous intéresserons aux effecteurs moléculaires dont les effets sur la cellule hôte aboutissent à un profond remaniement de l'architecture cellulaire et tissulaire. La résistance de *H. pylori* à l'acidité sera ensuite introduite.

3.2.3.1. L'îlot de pathogénicité *cag*

Une grande proportion des souches cliniques de *H. pylori* (entre 50 et 70%) sont porteuses d'un îlot de pathogénicité appelé *cag*. L'îlot comporte environ 30 gènes pour une taille de 37 kbp. La majorité de ces gènes codent pour les protéines de structure ou d'assemblage d'un système de sécrétion de type 4 (T4SS) (Censini *et al*, 1996). Cette région, acquise par transfert horizontal, est l'une des plus variables du génome de *H. pylori*. L'îlot peut en effet être entièrement présent, interrompu, comporter quelques délétions ou être totalement absent. Les souches possédant cet îlot sont très fortement associées à un risque accru de développement d'ulcères ou d'adénocarcinomes gastriques. Ainsi, 90% des souches responsables de cancer possèdent un îlot *cag* fonctionnel. Ces souches *cag*⁺ sont plus fréquentes en Asie (Blaser *et al*, 1995; Nomura *et al*, 2002).

Les T4SS constituent une famille de systèmes de transport de macromolécules largement distribuée chez les bactéries. Ils sont constitués d'une seringue moléculaire qui est impliquée dans le transfert ou la captation d'ADN et l'injection d'effecteurs dans les cellules de l'hôte, le milieu extérieur ou dans un partenaire bactérien. Le modèle du genre est le T4SS de *Agrobacterium tumefaciens*, bactérie oncogène de plantes qui transforme les cellules végétales hôtes par injection de matériel génétique et de protéines. Le T4SS de *A. tumefaciens* contient

11 gènes (*virB1* à *virB11*) et un gène codant pour une protéine de reconnaissance du substrat (*virD4*). Le T4SS de *H. pylori* est néanmoins peu homologue à ce prototype, et seulement quelques gènes possèdent des similitudes significatives avec le T4SS de *A. tumefaciens* (Kutter *et al*, 2008).

L'extrémité du T4SS de *H. pylori*, formée par la protéine CagL, lie le récepteur à l'intégrine $\beta_1\alpha_5$ présent à la surface des cellules épithéliales (Kwok *et al*, 2007). Le T4SS agit ensuite comme une seringue permettant l'injection de la protéine CagA (codée par un gène de *cag*, *cagA*) et de fragments de peptidoglycane dans la cellule hôte (Viala *et al*, 2004). L'interaction du T4SS avec la cellule et l'injection des fragments de peptidoglycane et de CagA est la principale cause de la synthèse d'IL-8 par les cellules gastriques, conduisant à une inflammation importante.

CagA est une protéine effectrice pro-oncogène. Son injection a des effets importants sur la biologie des cellules gastriques (Figure 10). Une fois dans la cellule hôte, CagA est phosphorylée par les kinases de la famille Src, sur les tyrosines de ses motifs EPYA, situés en C_{ter} de la protéine. Le nombre de motifs EPYA est variable d'une souche à l'autre et c'est notamment parce que les souches asiatiques possèdent plus de motifs EPYA qu'elles sont associées à une fréquence plus élevée de cancers gastriques. Suite à sa phosphorylation, CagA activée peut lier le motif SH2 de la tyrosine-phosphatase SHP-2 et dérégule son activité phosphatase, qui, en retour déphosphoryle la kinase FAK. Une autre étude a identifié la cortactine, protéine liant l'actine, comme une nouvelle cible en aval de la kinase ERK, activée par CagA. Lors de l'infection, la cortactine sérine-phosphorylée interagit avec ERK et stimule l'activité de la kinase FAK. Il en résulte des changements importants dans l'adhésion des cellules épithéliales, conduisant à une dispersion de l'architecture tissulaire. CagA phosphorylé induit un changement spectaculaire de la morphologie cellulaire ; la cellule adopte une forme allongée, dite *phénotype colibri* (Churin *et al*, 2003). De plus les cellules subissent un relâchement des jonctions serrées et sont sujettes à migration. Ces deux phénomènes sont courants dans les processus de tumorigénèse (Tegtmeyer *et al*, 2011b; Higashi *et al*, 2002; Selbach *et al*, 2002; Stein *et al*, 2002; Lai *et al*, 2011). Enfin, CagA stimule différentes voies de signalisation et conduit à la production de cytokines, de facteurs de prolifération, et de protéines anti-apoptotiques (Figure 10) (Lin *et al*, 2010).

CagA exerce aussi ses effets de manière indépendante de la phosphorylation des motifs EPYA. CagA active le facteur NFAT en stimulant la calcineurine. CagA est aussi capable de déréguler la voie de la β -caténine et de rompre l'équilibre E-cadhérine/ β -caténine. L'activation

de la β -caténine a été associée au processus d'oncogenèse dans le modèle gerbille d'infection à *H. pylori* (Franco *et al*, 2005).

CagA peut aussi stimuler de nombreuses autres voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, ayant pour conséquence l'activation de c-Fos et c-Jun, protéines proto-oncogènes (Meyer-ter-Vehn *et al*, 2000). CagA est également responsable d'un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules épithéliales, suggérant là aussi un lien de cette protéine avec l'oncogenèse (Saito *et al*, 2010).

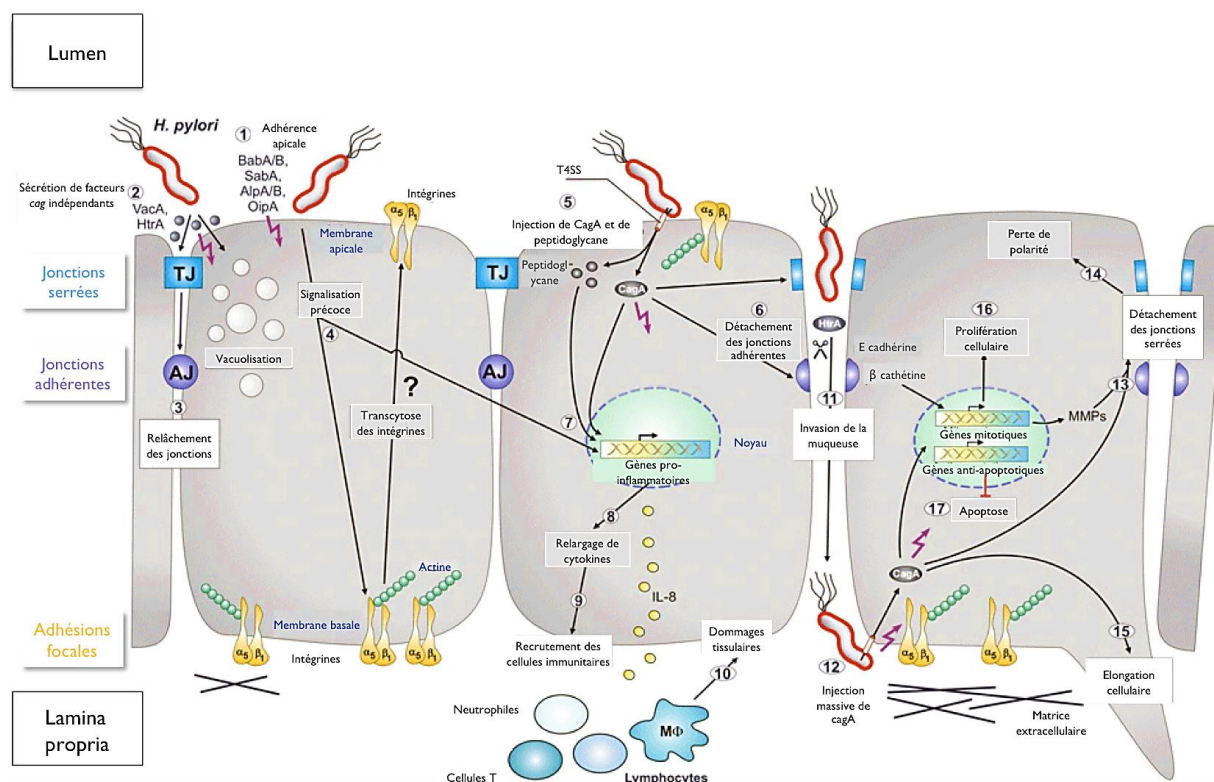


Figure 10 Modèle de pathogenèse intégrée induite par le T4SS et les adhésines de *H. pylori*

Les numéros entourés indiquent l'ordre des événements dans la cascade des effets produits par l'îlot *cag* et CagA. Figure adaptée de (Tegtmeyer *et al*, 2011a)

Les mécanismes décrits ici ne sauraient en aucun cas être exhaustifs, tant les effets de *cag*, CagA dépendants ou indépendants, sont nombreux (Figure 11). Pour une revue, voir (Tegtmeyer *et al*, 2011a). L'injection de CagA et de fragments du peptidoglycane par le T4SS, et leurs effets sur la synthèse de molécules pro-inflammatoires, la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose, en font un des déterminants majeurs de la physiopathologie de l'infection à *H. pylori*.

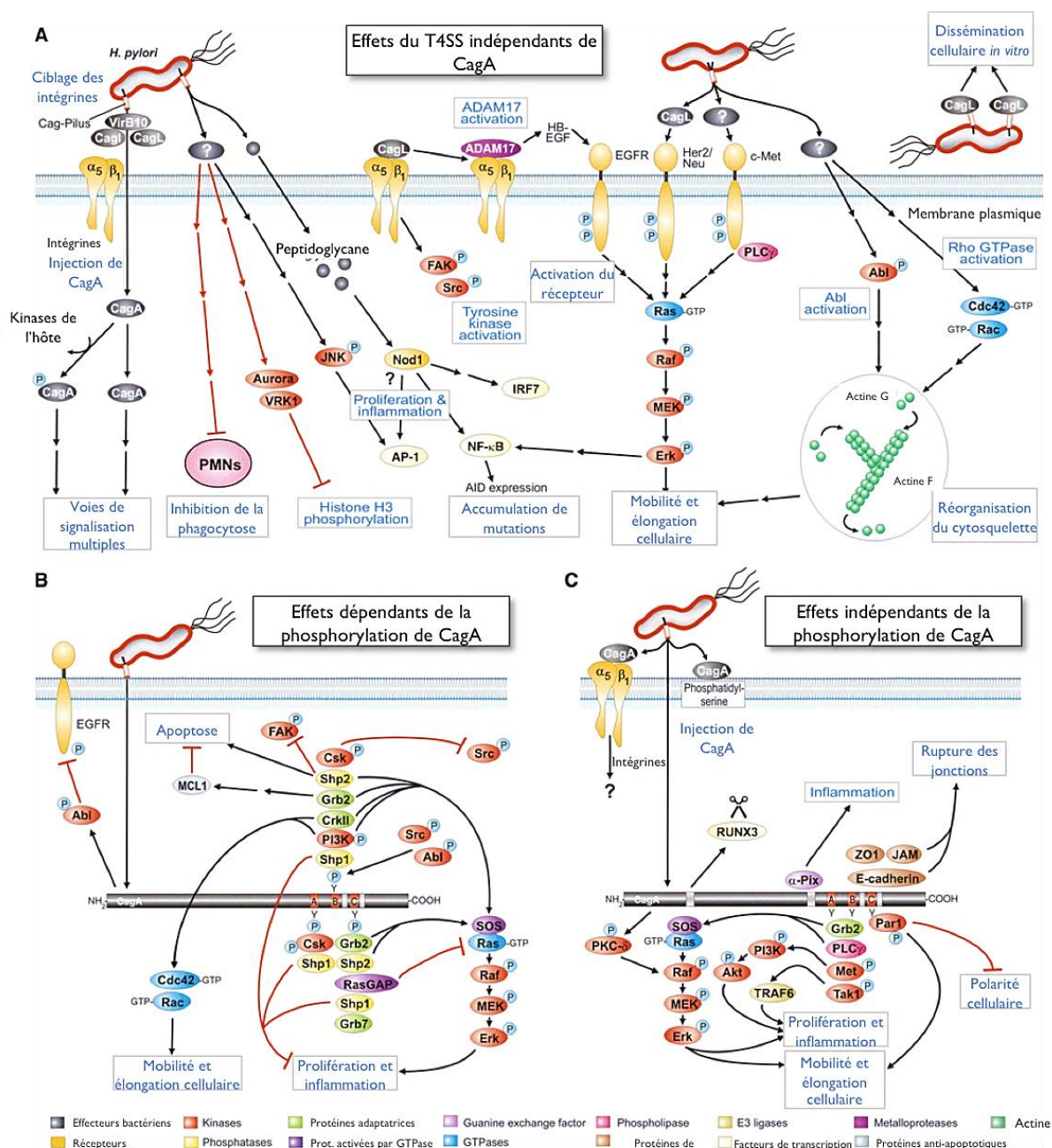


Figure 11 | Rôle du T4SS de *H. pylori* dans l'altération des voies de signalisation cellulaires

(A) Effets du contact du T4SS avec les cellules gastriques. (B) Effets de CagA, dépendants de la phosphorylation de CagA, sur la physiologie cellulaire. (C) Effets de CagA, indépendants de la phosphorylation de CagA, sur la physiologie cellulaire. Figure adaptée de (Tegtmeyer *et al*, 2011a)

3.2.3.2. La cytotoxine VacA

L'exotoxine VacA est une protéine multifonctionnelle capable d'interagir avec les cellules épithéliales et les cellules immunitaires. Son nom de « cytotoxine vacuolisante » lui vient de sa capacité à engendrer *in vitro* la formation de vacuoles dans les cellules eucaryotes.

Toutes les souches de *H. pylori* possèdent le gène de la cytotoxine VacA. Le gène est organisé en trois domaines codant pour trois régions de VacA. Chaque domaine peut être codé

par plusieurs allèles. La toxine VacA est donc constituée d'une région peptide signal (*s1* ou *s2*), une région intermédiaire (*i1* ou *i2*) et une région médiane (*m1* ou *m2*). Du fait de différences dans la structure génétique de *vacA*, les souches exprimeront une version de la protéine VacA plus ou moins sécrétée et fonctionnelle. La protéine codée par les allèles *s1/m1* est la plus active *in vitro* tandis que celle codée par les allèles *s2/m2* n'a pas d'effets cytotoxiques (Atherton *et al*, 1995). Ces observations expérimentales sont corrélées avec les études épidémiologiques qui associent la production d'une protéine VacA fonctionnelle à un risque accru d'ulcère et de cancer gastrique (van Doorn *et al*, 1998).

VacA est une protéine autotransporteur. Les autotransporteurs sont des protéines composées d'un peptide signal, d'un domaine N_{ter} passager, et d'un domaine C_{ter} translocateur. Ce domaine C_{ter} est indispensable au passage du domaine N_{ter} à la surface de la cellule. A la surface, le domaine N_{ter} peut alors être clivé pour être relâché.

La cytotoxine VacA est traduite sous forme d'une protoxine de 140 kDa, ensuite clivée pour former une protéine mature de 88 kDa. La protéine mature est sécrétée sous forme d'une protéine soluble. La toxine sécrétée de 88 kDa subit un clivage protéolytique ménagé dans l'estomac, pour donner deux fragments nommés p33 et p55, qui sont considérés comme les deux *sous-unités* de VacA. Plusieurs études indiquent que le fragment p55 joue un rôle important dans la liaison de VacA aux cellules épithéliales, alors que le fragment p33 contient un motif de dimérisation hydrophobe nécessaire à la formation des canaux transmembranaires (Cover & Blanke, 2005; Backert & Clyne, 2011).

La toxine mature s'assemble en structures hexamériques solubles, ou s'insérant dans la membrane plasmique des cellules épithéliales. L'insertion se fait préférentiellement au niveau de microdomaines lipidiques de la membrane plasmique. La structure macromoléculaire ainsi formée constitue un canal anion sélectif perméable au bicarbonate et aux anions organiques comme l'urée (Tombola *et al*, 2001).

VacA induit la formation de vacuoles *in vitro* dans de nombreux types cellulaires. Une fois insérée dans la membrane plasmique des cellules, VacA est internalisée par endocytose. La protéine forme des canaux anion sélectifs dans la membrane des endosomes. Les vacuoles grossissent alors sous l'effet d'un afflux d'ions Cl⁻, compensé par une augmentation de la concentration intravacuolaire d'ions ammonium et de protons (Cover & Blanke, 2005).

En plus de son action sur le compartiment endocyttaire tardif, VacA cause des altérations de la physiologie mitochondriale comme une réduction du potentiel transmembranaire ou un relargage du cytochrome c. Ces observations sont cohérentes avec la formation de pores dans la membrane des mitochondries. Le relargage du cytochrome c induit la voie des caspases et

l'apoptose (Cover & Blanke, 2005; Boquet & Ricci, 2012). Dans des conditions normales, les mitochondries sont organisées en réseau dynamique et vont en permanence fusionner les unes avec les autres et se diviser par fission. Récemment, des études ont établi que VacA est nécessaire et suffisant pour altérer la dynamique de fission des mitochondries (Jain *et al*, 2011). De tels événements ont déjà été rapportés dans les pathologies inflammatoires et neurodégénératives. En collaboration avec notre unité, il a été montré que l'infection à *H. pylori* provoque une accumulation de mutations dans le génome mitochondrial *in vitro* et *in vivo* et que de telles mutations sont associées à l'apparition de lésions préneoplasiques dans des souris colonisées par *H. pylori* (Machado *et al*, 2009). Pour conclure, les altérations de la physiologie mitochondriale sont corrélées à une diminution du *pool* d'ATP cellulaire et à une diminution de la prolifération cellulaire, en cohérence avec un dysfonctionnement des mitochondries (Cover & Blanke, 2005).

Peu de temps après son contact avec la cellule hôte, VacA interagit avec les voies de signalisation en activant les MAP kinases p38 et ERK. La toxine active aussi le récepteur protéine phosphatase β , avec pour conséquence, la phosphorylation de Git1. Ces activations provoquent un relâchement des jonctions serrées, une prolifération cellulaire et une induction de la mobilité cellulaire (Shirasaka *et al*, 2003; Nakayama *et al*, 2004).

VacA cible aussi les cellules immunitaires, créant des vacuoles dans les macrophages qui perturbent la maturation des phagosomes. Il est proposé que ce mécanisme permette une résistance de *H. pylori* à la phagocytose (Zheng & Jones, 2003). VacA interagit également avec les lymphocytes T par le récepteur intégrine β_2 . Ses effets conduisent à une perturbation de la protéolyse des antigènes et inhibent la présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II néosynthétisées (Molinari *et al*, 1998). Les effets de la toxine sur les lymphocytes T conduisent aussi à une inhibition de la production d'IL-2 et à une diminution de l'expression du récepteur à l'IL-2 (Gebert *et al*, 2003). Ces effets résultent de la capacité de VacA à inhiber l'activation du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT). NFAT agit comme un régulateur global de la transcription des gènes requis pour l'activation des cellules T. Ainsi les effets de VacA sur les cellules T interfèrent avec l'expression d'une centaine de gènes, conduisant à une suppression de la prolifération lymphocytaire et empêchent le système immunitaire de développer une réponse adaptative efficace contre *H. pylori* (Sundrud *et al*, 2004). Enfin, VacA agit de concert avec CagA pour promouvoir l'inflammation. En effet, VacA agit sur la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 (Supajatura *et al*, 2002).

Les effets de VacA sont donc complémentaires de ceux exercés par CagA. Ils aboutissent à une désorganisation de l'épithélium gastrique, à une immunosuppression, et à une augmentation de l'inflammation (Figure 12).

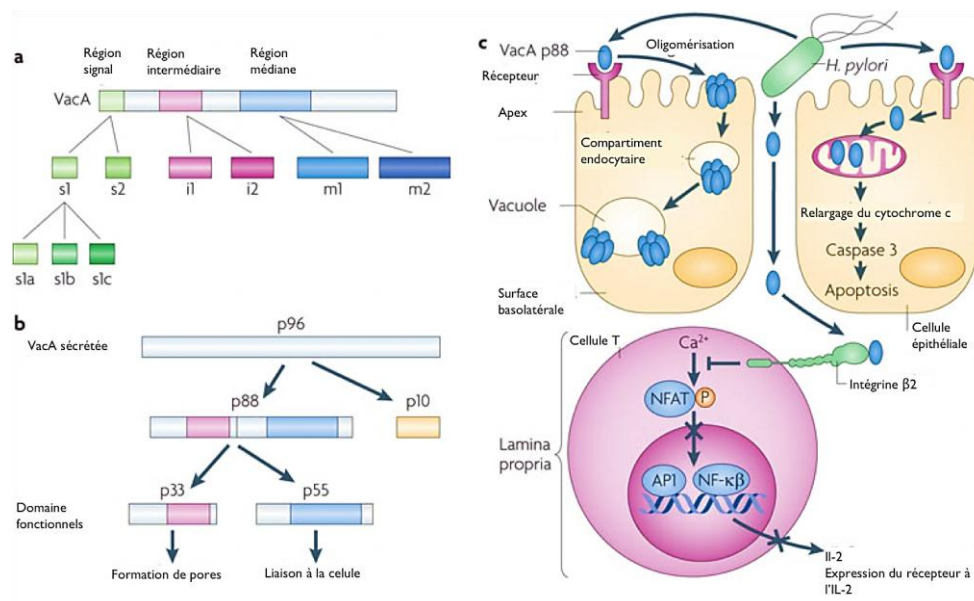


Figure 12 Maturation de la toxine et mécanismes moléculaires de la pathogenèse induite par VacA

(a) : mosaïsme allélique du gène *vacA*. (b) : maturation post-traductionnelle de la cytotoxine VacA. (c) : effets de VacA sur les voies de signalisation cellulaire. Figure adaptée de (Polk & Peek, 2010).

Des études indiquent que VacA n'est pas nécessaire à la colonisation du modèle animal mais que sa présence confère un avantage sélectif lors de la persistance de l'infection (Salama *et al*, 2001). De plus, le fait qu'aucun orthologue de *vacA* n'ait été détecté dans les *Helicobacter* colonisant les mammifères autres que l'homme semble indiquer que cette protéine apporterait un avantage sélectif pour la colonisation de l'estomac humain. L'avantage pourrait être d'ordre nutritionnel, les canaux pouvant compromettre l'imperméabilité épithéliale et faire transiter les nutriments des cellules vers les bactéries (Papini *et al*, 1998).

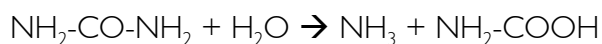
3.2.4. Résistance à l'acidité et métabolisme de l'ammoniac

Il est impossible d'introduire les déterminants bactériens de la virulence sans évoquer les mécanismes de résistance à l'acidité. De la lumière gastrique au pH très acide (pH médian 1,4), jusque dans le mucus, qui présente un gradient de pH modéré entre 5 et 7, *H. pylori* traverse des environnements extrêmes. Dès la découverte de *H. pylori*, la présence d'une intense activité uréasique a été rapportée comme un trait commun aux différentes souches (Buck, 1990). La caractérisation de l'uréase et des autres enzymes productrices d'ammoniac a ouvert la voie à la compréhension des mécanismes de résistance à l'acidité de *H. pylori*.

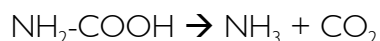
3.2.4.1 L'uréase

La principale ligne de défense de *H. pylori* contre l'acidité repose sur une enzyme appelée uréase, dont le niveau d'expression physiologique est bien plus important que les uréases des autres organismes (Labigne *et al*, 1991; Mobley *et al*, 1995b). L'uréase est la protéine la plus abondante chez *H. pylori*, et représente entre 6 et 10% de la masse totale des protéines cellulaires (Hu & Mobley, 1990). Cette enzyme est essentielle à la colonisation de nombreux modèles animaux (Eaton & Krakowka, 1994; Tsuda *et al*, 1994; Wirth *et al*, 1998). Elle constitue un antigène potentiel majeur de *H. pylori* qui a fait l'objet de nombreux essais en l'utilisant comme candidat vaccin (Del Giudice *et al*, 2009). A ce jour, aucun vaccin n'a permis de mettre en place une réponse immunitaire suffisante pour éradiquer la bactérie.

L'uréase de *H. pylori* est une métalloenzyme à nickel. Son K_M est le plus bas de toutes les uréases caractérisées. L'uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et carbamate selon la réaction suivante :



A pH physiologique, le carbamate se dissocie spontanément en ammoniac et dioxyde de carbone :



L'urée est une molécule présente dans le sang qui provient de la dégradation de certains acides aminés dans le foie. L'urée parviendrait dans l'estomac grâce à la diffusion paracellulaire, établissant une concentration en urée dans le jus gastrique égale à celle du sang, comprise entre 1 et 3 mM (Sachs *et al*, 2005). Phadnis *et al*. ont proposé que le rôle de l'uréase dans la résistance à l'acidité dépendrait d'une fraction des bactéries infectantes qui exploserait sous l'effet de l'acidité ; l'uréase ainsi relarguée lierait la membrane externe des bactéries survivantes, et, en consommant l'urée présente dans le jus gastrique, permettrait la création d'un microenvironnement neutre autour de la bactérie (Phadnis *et al*, 1996). Cependant, cette hypothèse est contredite par plusieurs observations : l'uréase est peu résistante à l'acidité et possède un optimum de fonctionnement à pH neutre. De plus le *lumen* gastrique, dans laquelle sont sécrétés 150 mmol d'acide chlorhydrique par jour, serait impossible à tamponner au vu de la concentration en urée de l'estomac (Sachs *et al*, 2005).

La preuve indirecte de la localisation cytoplasmique de l'uréase a été apportée par les expériences démontrant que l'urée transitait du milieu extérieur jusque dans le cytoplasme *via* un transporteur intégral de membrane interne, Urel, formant un canal ouvert uniquement à pH acide. La délétion du gène codant pour ce transporteur chez *H. pylori* aboutit à une diminution

drastique de l'activité uréasique *in vivo*, une perte de son augmentation d'activité à pH acide et une incapacité à coloniser l'animal (Skouloubris *et al*, 1998; Bury-Moné *et al*, 2001; Scott *et al*, 2000). Le dioxyde de carbone et l'ammoniac peuvent diffuser au travers de la membrane plasmique et il a été proposé que les ions ammonium étaient exportés jusque dans le milieu extracellulaire par un mécanisme encore non identifié (Stingl *et al*, 2002). Une étude récente fait l'hypothèse que l'ammoniac pourrait lui-même être exporté *via* Urel (Scott *et al*, 2010). C'est pourquoi, conjointement au maintien de l'homéostasie du pH intracellulaire, l'activité uréasique de *H. pylori* serait responsable d'une élévation locale du pH autour de la bactérie. Il est proposé que ce mécanisme évite l'intoxication de la bactérie par l'ammoniac.

L'ammoniac produit joue très probablement un rôle dans la pathogenèse. Il a été démontré qu'il avait un effet cytotoxique sur les cellules en culture, et que son administration chronique à des rats était responsable d'une atrophie de la strate de mucus et d'une accélération de la prolifération épithéliale dans l'estomac (Athmann *et al*, 2000; Tsujii *et al*, 1993). Différentes études suggèrent que seule une partie du *pool* d'uréase soit chargé en nickel en permanence, une petite fraction active suffisant à assurer la résistance à l'acidité (Stingl *et al*, 2008). A ce titre, la synthèse d'ammoniac par *H. pylori* pourrait être tout à la fois impliquée dans la résistance à l'acidité, le métabolisme et la virulence. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'uréase est essentielle à la colonisation de porcelets, même quand ceux-ci ont été traités pour avoir un estomac à pH neutre (Eaton & Krakowka, 1994).

3.2.4.2. Autres enzymes productrices d'ammoniac

En plus de l'uréase, *H. pylori* possède de nombreuses enzymes productrices d'ammoniac comme les déamidases, largement répandues dans le monde bactérien, ainsi que deux amidases aliphatiques.

3.2.4.2.1. Les amidases

H. pylori possède deux amidases aliphatiques : AmiE et AmiF (Skouloubris *et al*, 2001). Ces enzymes sont largement répandues parmi les microorganismes environnementaux, comme *Pseudomonas aeruginosa*, et catalysent l'hydrolyse des amides à courtes chaînes en ammoniac et acides organiques.

AmiE est une amidase prototype de 40 kDa présentant 75% d'identité de séquence avec les orthologues présents chez les bactéries environnementales. AmiE hydrolyse le propionamide, l'acrylamide et l'acétamide (Skouloubris *et al*, 2001).

AmiF est une protéine paralogue à AmiE présentant 34% d'identité de séquence avec celle-ci. AmiE hydrolyse le formamide, la plus courte des amides aliphatiques. La présence d'une formamidase chez *H. pylori* est une surprise car peu de microorganismes ont démontré leur capacité à utiliser le formamide comme source d'azote. De plus, les formamidases précédemment décrites n'appartenaient pas à la classe des amidases aliphatiques (Skouloubris *et al*, 2001).

Il a été montré que l'activité de ces amidases était négativement régulée par la présence d'une uréase et d'une arginase fonctionnelle. Chez *H. pylori*, l'arginase est une enzyme catalysant l'hydrolyse de l'arginine en ornithine et en urée (Mendz & Hazell, 1996). Ces données indiquent que les amidases agissent de manière intégrée avec les autres partenaires du métabolisme de l'ammoniac afin de maintenir la concentration en ammoniac intracellulaire à un niveau physiologique.

Malgré cette caractérisation, le rôle des amidases *in vivo* reste énigmatique. En effet, les substrats identifiés de ces enzymes sont des molécules toxiques pour l'homme qui ne sauraient être présentes en grandes quantités dans l'estomac. Par conséquent les substrats réels *in vivo* sont différents. Bien que non essentielles à la colonisation du modèle animal, les gènes codant pour AmiE et AmiF sont présents dans tous les génomes de *H. pylori* analysés. De plus, le couple de gènes *amiE amiF* n'est retrouvé que chez *H. pylori* et *H. acinonychis*, l'espèce la plus proche phylogénétiquement. Parmi les *Helicobacter* non *pylori*, seul *H. felis*, code pour *amiF*, et *H. muridarum*, à tropisme entérohépatique pour *amiE* (Bury-Moné *et al*, 2003). Enfin, il a été montré que des anticorps dirigés contre AmiE étaient plus fréquemment retrouvés dans les séra de patients présentant un cancer gastrique, signant un rôle possible de ces enzymes dans la pathogenèse à *H. pylori* (Haas *et al*, 2002).

3.2.4.2.2. Enzymes périplasmiques

H. pylori utilise majoritairement les acides aminés comme source de carbone et d'énergie. Cette bactérie consomme de grandes quantités d'aspartate, asparagine, glutamate et glutamine (Mendz & Hazell, 1995). De plus, une intense activité asparaginase et glutaminase a été rapportée chez *H. pylori*, menant au relargage d'ammoniac dans le milieu extérieur (Stark *et al*, 1997).

L'activité glutaminase détectée repose sur l'enzyme sécrétée γ -Glutamyl transpeptidase (γ GT). Chez *H. pylori*, cette enzyme périplasmique catalyse l'hydrolyse de la glutamine en ammoniac et glutamate. Elle a démontré des effets pro-apoptotiques sur des cellules en culture en ciblant les mitochondries (Shibayama *et al*, 2003; Kim *et al*, 2007). Elle possède aussi une

capacité de perturbation de la prolifération des cellules épithéliales et des lymphocytes T (Busiello *et al*, 2004; Schmees *et al*, 2007). Enfin, c'est un facteur de colonisation si ce n'est essentiel, au moins majeur (Chevalier *et al*, 1999b; McGovern *et al*, 2001).

L'asparaginase de *H. pylori* est codée par le gène *ansB*. L'enzyme purifiée est capable d'hydrolyser l'asparagine et d'avoir un effet cytotoxique sur les cellules gastriques en culture (Cappelletti *et al*, 2008). La localisation périplasmique de l'enzyme a été démontrée au cours de ce travail de thèse et fera l'objet d'un développement approfondi dans la partie expérimentale (Leduc *et al*, 2010). Comme pour la γ GT, la délétion de *ansB* conduit à un désavantage sélectif pour *H. pylori* qui devient incapable de coloniser le modèle animal en compétition avec une souche sauvage (Merrell *et al*, 2003).

Conjointement à la production d'ammoniac dont nous avons déjà évoqué les effets cytotoxiques, la déplétion en acides aminés comme la glutamine est un potentialisateur de l'inflammation causée par *H. pylori* (Hagen *et al*, 2009). En accord avec nos résultats, AnsB et γ GT, enzymes productrices d'ammoniac au plus près de l'épithélium gastrique, jouent donc un rôle important en tant que facteurs de virulence, indépendamment des mécanismes de résistance à l'acidité.

3.2.4.3. Complexes protéiques associés à l'uréase

Les interactions protéines-protéines sont au cœur des processus cellulaires. Identifier les partenariats s'établissant entre protéines permet d'avoir une compréhension des interconnexions entre fonctions métaboliques et circuits de régulation. Les études interactomiques révèlent l'assemblage supramoléculaire des enzymes, mais aussi les partenaires de maturation des protéines. Enfin, par l'interactomique, nous obtenons des indications sur les couplages métaboliques entre enzymes transformant un composé dont le produit sera le substrat d'une réaction enzymatique portée par un partenaire.

3.2.4.3.1. Que nous apprend l'interactome de l'uréase ?

L'uréase (UreA-B) est l'enzyme la plus abondante chez *H. pylori*. Requérant du nickel pour être active, elle nécessite des protéines accessoires pour incorporer le cofacteur métallique dans le centre actif (UreE à UreG).

Une première étude menée à l'échelle génomique en double hybride de levure (Y2H) a permis d'avoir une vue globale des interactions s'établissant entre les protéines de *H. pylori* (Rain *et al*, 2001). Concernant l'uréase, les informations succinctes extraites de cette étude sont les suivantes : l'interaction des sous-unités structurales entre elles (UreA/UreA et UreA/UreB),

et l'interaction de UreA avec l'une des quatre protéines accessoires (UreA/UreH). Deux à deux, les interactions entre les protéines accessoires sont les suivantes : UreE/UreG et UreF/UreH.

Pour pallier aux limites du Y2H (surexpression des protéines en système hétérologue, nombreux faux positifs), la méthode de purification par affinité en tandem des complexes protéiques (TAP) a été adaptée à *H. pylori* dans notre laboratoire et a été appliquée à l'étude de l'interactome de l'uréase (Stingl *et al.*, 2008). Cette méthode permet l'expression des protéines en quantités physiologiques dans l'organisme d'origine. La purification des complexes est ensuite réalisée sur deux colonnes d'affinité successives permettant d'éliminer les interactions aspécifiques tout en conservant les complexes dans leur configuration native. Ces conditions stringentes autorisent une grande confiance dans la pertinence des complexes identifiés, mais ne permet que rarement de capturer les interactions transitoires ou de faible affinité. C'est pourquoi Stingl *et al.* ont établi une approche impliquant un *crosslink* ménagé des protéines bactériennes pour isoler les complexes protéiques transitoires. Les complexes sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, et les protéines individuelles identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Stingl *et al.*, 2008).

L'interactome de l'uréase a confirmé l'organisation supramoléculaire de l'uréase déjà résolue par la structure du complexe actif (Ha *et al.*, 2001). L'étude en TAP a aussi permis la purification d'un complexe complet de biosynthèse du centre catalytique à nickel (Figure 13). Enfin, en utilisant différents appâts (sous-unités structurales ou protéines accessoires), HypB et SlyD, protéines participant à la maturation de l'hydrogénase, une autre enzyme à nickel, ont été montrées comme associées à l'uréase. Une étude génétique avait déjà démontré que l'activation de l'uréase nécessitait une voie de maturation de l'hydrogénase fonctionnelle (Olson *et al.*, 2001). L'étude en TAP apporte la preuve d'une interconnexion physique entre les voies de maturation des deux enzymes à nickel chez *H. pylori*. Une interconnexion existe aussi pour la voie de biosynthèse des centres [Fe-S] puisque la protéine HypB interagit avec l'uréase et avec les protéines NifU et NifS ainsi qu'avec les protéines de stockage du fer Pfr (ferritine) et NapA.

Parallèlement au complexe uréase/protéines accessoires, l'étude de Stingl *et al.* a démontré l'interaction entre l'uréase et la glutamine synthétase GlnA (Stingl *et al.*, 2008). GlnA catalyse la fixation d'une molécule d'ammonium sur le glutamate pour former de la glutamine, de manière ATP-dépendante. La glutamine intervient dans de nombreux processus cellulaires et les

spécificités du métabolisme de la glutamine chez *H. pylori* seront discutés plus loin dans ce travail (Reitzer, 1996).

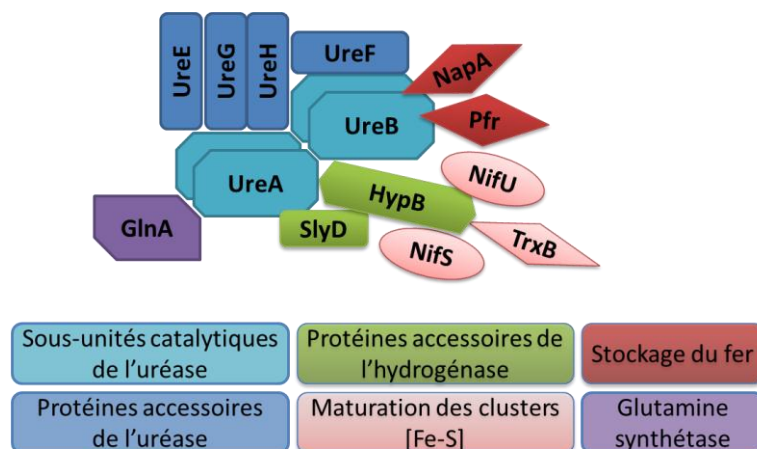


Figure 13 Complexes protéiques interagissant avec l'uréase

L'étude de l'interactome de l'uréase a permis de placer cette enzyme au cœur des processus cellulaires de *H. pylori*. La coopération physique qui s'établit entre voies de maturation et de biosynthèse suggère fortement un couplage fonctionnel entre protéines.

3.2.4.3.2. L'hypothèse du channeling de l'ammoniac

La mise en évidence de l'interaction physique entre UreA et la glutamine synthétase nous a amené à émettre des hypothèses sur les couplages métaboliques *in vivo*. La glutamine synthétase est une enzyme essentielle chez *H. pylori*. Il est impossible d'en réaliser la délétion, même en rajoutant une forte concentration de glutamine dans le milieu de culture (Stingl *et al*, 2008). Au cours de ce travail de thèse, nous avons démontré que la glutamine n'est pas importée par *H. pylori* et qu'elle n'est produite que par GlnA. Le caractère essentiel de GlnA s'explique donc par le fait que la glutamine n'est pas importée et que GlnA est la seule voie biosynthèse de la glutamine chez *H. pylori*.

De manière intéressante, un canal physique permettant le *channeling* de l'ammoniac a été mis en évidence au sein du complexe GatCAB de *Staphylococcus aureus* (Nakamura *et al*, 2006). Chez de nombreuses bactéries, les $\text{ARN}_t^{\text{Gln}}$ et $\text{ARN}_t^{\text{Asn}}$ sont chargés de manière erronée avec du glutamate par une glutamyl-tRNA-synthétase non-discriminante. Le complexe GatCAB catalyse alors la déamidation d'une molécule de glutamine et la fixation de la molécule d'ammoniac produite sur le glutamate de l' ARN_t mésacylé (Schön *et al*, 1988). L'étude de Nakamura *et al*. a permis de modéliser par cristallographie un canal de 10 Å de long reliant le

site d'hydrolyse de la glutamine dans GatA au site de fixation de l'ammonium produit dans GatB, indiquant fortement un transfert balisé de l'ammoniac au sein d'un complexe enzymatique (Figure I4). Ce type de *channeling* évite la dispersion de l'ammoniac dans le cytosol, sa diffusion, ou sa protonation, et permet l'optimisation de l'activité du complexe.

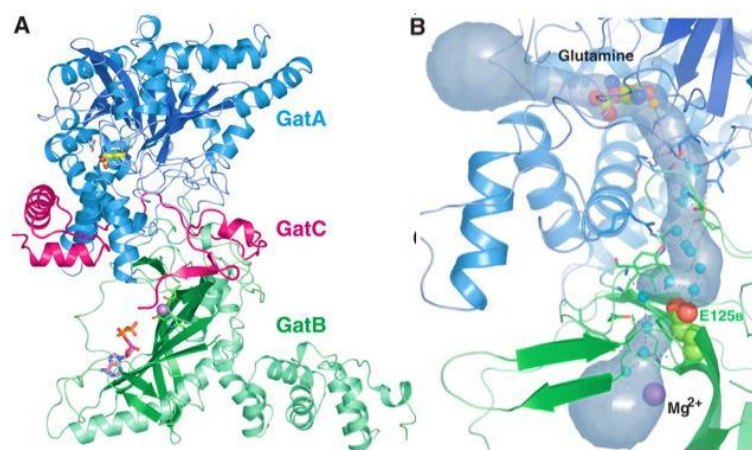


Figure I4 Diagramme en hélices du complexe GatCAB de *S. aureus*

Organisation macromoléculaire du complexe protéique GatCAB (A) et modélisation du canal à ammoniac entre le site d'hydrolyse de la glutamine de GatA et le site de fixation de l'ammonium sur le glutamate de GatB (B). Figure issue de (Nakamura *et al*, 2006).

Nous avons proposé que l'interaction entre UreA et GlnA permette une optimisation du métabolisme de l'ammoniac chez *H. pylori* : l'uréase produirait de l'ammoniac qui serait directement utilisé par la glutamine synthétase. L'ammoniac ferait alors l'objet d'un *channeling* métabolique entre UreA et GlnA ayant pour effet d'optimiser la biodisponibilité de ce composé pour optimiser la synthèse de glutamine (Stingl *et al*, 2008). Un tel mécanisme de couplage a déjà été mis en évidence chez *E. coli* où l'activité de la glutamine synthétase est couplée à celle du transporteur d'ammonium AmtB (Javelle *et al*, 2005).

Chapitre 2. Le métabolisme du nickel chez *Helicobacter pylori*

I. Introduction

I.1. De l'importance des métalloenzymes

Tous organismes confondus, on estime qu'un tiers des protéines nécessite la coordination d'un ion métallique pour assumer leur fonction (Waldron & Robinson, 2009). Cette fonctionnalité repose sur les caractéristiques structurales que le métal va apporter à la protéine, mais aussi sur le pouvoir catalytique procuré par la modification du flux d'électrons au sein de l'enzyme ou du substrat (Glusker *et al*, 1999). La spécificité catalytique apportée par le cofacteur permet d'ailleurs d'envisager un potentiel de réactions virtuellement illimité en remplaçant le métal coordonné par un autre. Ces propriétés sont d'ailleurs utilisées en chimie enzymatique où des métalloenzymes artificielles permettent de réaliser de nouvelles réactions biochimiques (Rousselot-Pailley *et al*, 2009; Cavazza *et al*, 2010; Deuss *et al*, 2011).

Dans le monde bactérien, zinc, manganèse, molybdène, nickel, fer et cobalt représentent les principaux ions métalliques coordonnés. Ils sont les cofacteurs d'enzymes prenant part à des processus biologiques extrêmement variés, généralement responsables de réactions d'oxydoréduction. Les différents états redox des cofacteurs métalliques permettent aux enzymes d'assurer une grande variété de fonctions : oxydation, respiration, métabolisme des nitrates, etc. (Figure 15).

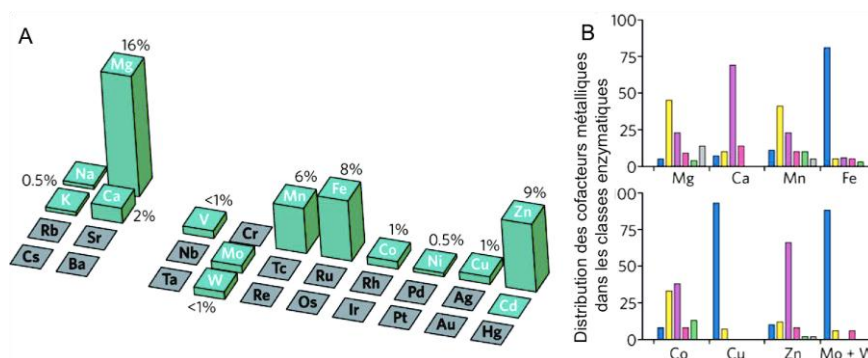


Figure 15 Cofacteurs métalliques utilisés dans la catalyse

Les éléments utilisés dans la catalyse sont représentés sur la figure (A). La hauteur des barres est proportionnelle à la fréquence d'utilisation du métal respectif parmi toutes les structures enzymatiques résolues. La proportion des différentes classes d'enzymes utilisant le cofacteur métallique indiqué est représenté sur la figure (B) bleu, oxydoréductases ; jaune, transférases ; violet, hydrolases ; rose, lyases ; vert, isomérases ; gris, ligases. Figure adaptée de (Waldron *et al*, 2009).

L'importante diversité des cofacteurs est le reflet des processus auxquels ils prennent part. L'unicité de certains couples enzyme/cofacteur constitue parfois une signature de certains microorganismes. Alors que les résistances aux antibiotiques conventionnels augmentent, cibler les métalloenzymes paraît être une piste sérieuse en recherche thérapeutique antibactérienne (White *et al*, 2003).

1.2. Homéostasie des métaux chez les bactéries

La toxicité et l'essentialité sont deux caractéristiques propres aux métaux de transition, exploitées tant par l'hôte que par les bactéries pathogènes. La toxicité des métaux est effective même à des doses très faibles et s'exerce principalement par une métallation incorrecte des protéines, et pour certains métaux, par la création de radicaux oxygénés qui vont endommager les macromolécules biologiques. Par conséquent, hôte et pathogène se livrent une *bataille* pour l'acquisition et la séquestration des métaux.

1.2.1. Principes du maintien de l'homéostasie du fer

Représentatif des stratégies utilisées par les bactéries pour l'accès aux métaux de transition, le maintien de l'homéostasie du fer chez les pathogènes a été étudié de manière détaillée.

1.2.1.1. Acquisition du fer

Le fer est un composé relativement insoluble en présence d'oxygène ; sous forme ferrique (Fe^{3+}), sa solubilité est de 10^{-17} M à pH 7. On estime que *E. coli* a besoin d'une concentration en fer comprise entre 10^{-7} et 10^{-5} M pour maintenir un taux de croissance optimal. Par

conséquent, *E. coli* possède des systèmes d'acquisition de haute affinité lui permettant de satisfaire ses besoins en fer (Andrews *et al*, 2003).

Une première stratégie repose sur la sécrétion de molécules de haute affinité pour le fer appelées sidérophores. Ces molécules de faible poids moléculaire sont généralement sécrétées en grande quantité par la bactérie dans des conditions de disponibilité en fer limitées et présentent une affinité pour leur substrat extrêmement élevée (Pour l'entérobactine, $K_{\text{aff}} \approx 10^{-30}$ M) (Saha *et al*, 2012). Environ 500 sidérophores ont été identifiés dans le monde bactérien (Drechsel & Winkelmann, 1997). Ils sont synthétisés de manière indépendante des ribosomes à partir d'acides aminés non protéinogènes, de citrate, d'acide dihydroxybenzoïque, de sérine, *etc.* Le site de fixation du fer est généralement constitué par des groupements hydroxamate, carboxylate ou catéchol organisés en hexadentate (Winkelmann, 2002). Les sidérophores les mieux étudiés sont l'entérobactine et le ferrichrome (Figure 16).

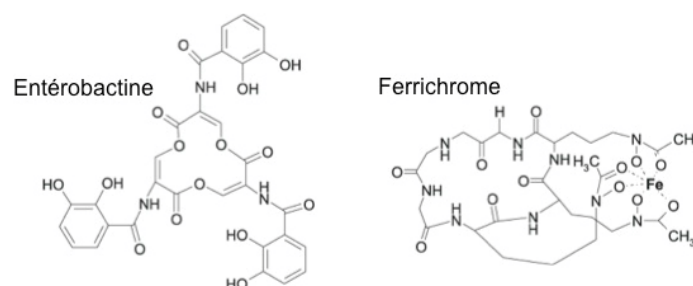


Figure 16 Structure moléculaire de l'entérobactine et du ferrichrome

Entérobactine et ferrichrome sont sécrétés par des protéines de transport spécifiques. Dans le milieu extérieur, ils pourront lier le fer. Cependant, les sidérophores sont trop volumineux pour pouvoir passer la membrane externe *via* des porines et doivent être importés par des systèmes de transport dédiés de haute affinité. Ils vont donc être pris en charge par des protéines de reconnaissance des ferri-sidérophores. Chez *E. coli*, l'entérobactine et le ferrichrome sont pris en charge par les récepteurs FepA, FecA et FhuA. Ce sont des protéines intégrales de membrane externe, énergisées par le système TonB-ExbB-ExbD (Transporteurs TonB-dépendants, TBDT). Les TBDT forment un canal où le ligand Fe^{3+} + sidérophore lie une poche, qui, sous l'effet d'un changement conformationnel, contacte la machinerie TonB ; grâce à l'énergie délivrée, le ferri-sidérophore est transloqué vers le périplasme (Figure 17) (Higgs *et al*, 1998; Ferguson *et al*, 2002).

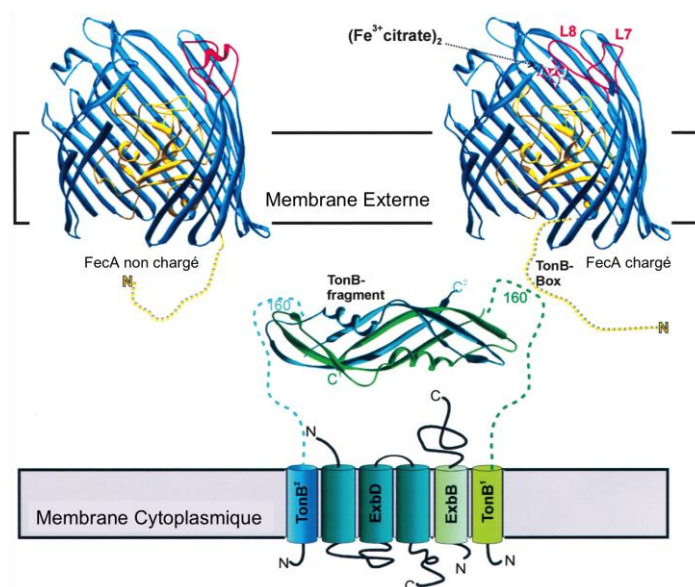


Figure 17 Mode de fonctionnement du transporteur de sidérophores FecA de *E. coli*

Figure adaptée de (Braun & Braun, 2002).

Dans le périplasme, le complexe Fe^{3+} + sidérophore est pris en charge par des protéines de liaison périplasmiques comme FhuD chez *E. coli*, appartenant à l'ABC transporteur FhuBCD. Ces protéines font la navette entre le transporteur de membrane externe et le transporteur de membrane interne du complexe (Köster, 2001).

Au niveau de la membrane interne, le ferri-sidérophore est internalisé *via* des perméases de la famille *ATP Binding Cassette* (ABC). Les ABC transporteurs comprennent quatre modules : deux protéines intégrales de membrane interne pour la perméase et deux modules ABC localisés à la surface interne de la membrane cytoplasmique pour énergiser le système par hydrolyse de l'ATP (Köster, 2001; Schalk *et al*, 2011).

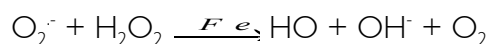
1.2.1.2. Stockage du fer

Une fois dans le cytoplasme, le fer doit être utilisable et donc extrait du sidérophore. Ceci peut s'opérer de deux façons. Premièrement, par action d'une estérase qui hydrolyse les liaisons ester de la ferri-entérobactine (Andrews *et al*, 2003). Par perte d'affinité pour le fer, l'entérobactine se détache alors du métal. Deuxièmement par action d'enzymes à activité de réductase ferrique (flavine réductase, sulfite réductase) qui réduisent l'ion Fe^{3+} en Fe^{2+} ayant une faible affinité pour les sidérophores (Fontecave *et al*, 1994).

Une fois libéré et réduit en Fe^{2+} , l'ion ferreux peut provoquer dans la cellule la réaction de Fenton :



Plus largement, le métabolisme aérobie engendre la création d'espèces réactives de l'oxygène. La réaction de Fenton est alors incluse dans la réaction de Haber-Weiss :



Les entités oxygénées réactives créées, OH^{\cdot} et $\text{O}_2^{\cdot-}$, sont extrêmement toxiques et peuvent attaquer toutes les macromolécules. Le fer intracellulaire doit donc être complexé pour éviter ces effets délétères. Les bactéries possèdent des protéines de stockage du fer. Les ferritines, bactérioferritines et protéines Dps forment des structures homomultimériques d'environ 500 kDa qui fixent le fer en grandes quantités (jusqu'à 3000 atomes par molécule). Le fer est fixé sous forme ferrique alors qu'il est sous forme ferreuse dans le cytoplasme. Les protéines de stockage ont en effet la capacité d'oxyder le Fe(II), grâce à un domaine ferroxidase, en même temps qu'elles le fixent (Andrews, 1998). Ces différentes protéines constituent des réserves de fer qui pourront être exploitées lors de l'appauvrissement du milieu.

1.2.1.3. Régulation transcriptionnelle de l'homéostasie du fer

Le métabolisme du fer chez *E. coli* est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel Fur. Fur est un homodimère de 17 kDa qui se complexe au Fe(II). Fur chargé avec le fer se lie alors au promoteur des gènes impliqués dans l'acquisition du fer et réprime leur transcription. Quand la concentration en fer est limitée, Fur se retrouve sous forme apo. La perte d'affinité de Fur pour l'ADN est d'un facteur 1000 environ. Les cibles de Fur sont alors déréprimées et le fer réimporté.

Les gènes impliqués dans l'acquisition du fer ne sont pas les seuls à répondre à Fur. En effet, sur les 90 gènes régulés par Fur chez *E. coli*, seulement 35 sont impliqués dans l'importation du fer. Fur est donc un régulateur global dont les cibles, impliquées dans la mobilité, la respiration, la glycolyse, *etc.*, forment un modulon (Hantke, 1987). L'inactivation de Fur a des effets drastiques sur la cellule qui est alors incapable de croître sur un milieu ne contenant pas de sources de carbone fermentescibles et devient hypersensible au stress oxydatif, probablement par surcharge en fer (Touati *et al*, 1995). Il a été montré que Fur régule directement certains gènes impliqués dans l'importation et le stockage du fer alors qu'un certain nombre de cibles est régulé de manière indirecte par un petit ARN régulateur, RyhB, lui-même régulé par Fur. Cet ARN est induit en cas de carence en fer et entraîne la dégradation des ARNm codant pour des protéines non-essentiels fixant le fer. Le fer va ainsi être disponible pour les protéines nécessaires à la survie de la bactérie (Massé *et al*, 2005; Bos, 2008).

I.2.1.4. Mécanismes d'efflux

En conditions anaérobies ou acides, le fer est majoritairement retrouvé sous forme ferreuse soluble. Chez *E. coli*, son importation devient alors indépendante des mécanismes précédemment décrits et passe par la perméase FeoABC, énergisée par l'hydrolyse du GTP (Hantke, 2003). Cette perméase n'est cependant pas régulée par Fur. Dans ces conditions, comment se débarrasser du fer en excès quand par exemple les protéines de stockage sont saturées ?

E. coli possède une pompe d'efflux, ZupT (*Zinc uptake transporter*) dont le rôle initial a été démontré dans la résistance aux concentrations excessives de zinc. Cependant, le spectre d'activité de ZupT s'avère plus large. En effet, le transporteur est capable de faire sortir de la cellule le fer, le zinc, le manganèse, le cadmium et le cobalt sous leur état d'oxydation (II). L'expression de *zupT* étant aussi indépendante des métaux, ZupT constitue un système constitutif empêchant l'intoxication ferreuse (Grass *et al*, 2005).

Le maintien de l'homéostasie du fer chez *E. coli* représente un système prototypique qui ne saurait faire loi au vu de la diversité des microorganismes et des ions métalliques importés. Cependant, les grandes fonctions d'importation, de régulation, de stockage et d'efflux sont retrouvées dès lors qu'un métal est essentiel à une bactérie.

I.3. Le nickel dans le monde bactérien

I.3.1. Introduction

Le nickel est un métal de transition, de numéro atomique 28. Concentré dans la croûte terrestre, il est relargué dans l'atmosphère lors des éruptions volcaniques ou par la pollution industrielle. Le nickel est un métal relativement abondant à la surface du globe de 0,4 à 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les eaux de mer ou douces. Certains organismes comme les mollusques peuvent concentrer le nickel jusqu'à 4 mg.kg^{-1} (Réseau national d'observation de la qualité du milieu marin, 2001). Pourtant, le nickel est un composé toxique pour l'homme ; c'est le plus allergisant des métaux, responsable de dermatites de contact chez 12% de la population (Schram *et al*, 2010). L'exposition chronique au nickel peut provoquer des cancers du poumon et, à ce titre, le nickel est classé comme composé carcinogène par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer, 1990). Bien qu'il soit considéré comme un micronutriment essentiel, aucune métalloenzyme à nickel n'a jusqu'à présent été identifiée chez l'homme (Denkhaus & Salnikow, 2002).

1.3.2. Toxicité du nickel chez les bactéries

Chez les microorganismes, il était admis que la toxicité du nickel ne concernait que les bactéries vivant dans le sol pollués, ou naturellement riche en nickel (Babich & Stotzky, 1983). Cependant, la découverte de la pompe d'efflux à nickel RcnA chez *E. coli* a bouleversé ce dogme. La large distribution des homologues de RcnA chez les bactéries suggère que la toxicité du nickel est un phénomène physiologique courant, même chez les microorganismes commensaux ou pathogènes (Rodrigue *et al*, 2005). Malgré cette toxicité, les bactéries ont mis en place des stratégies d'acquisition efficaces de l'ion nickel Ni^{2+} . Soluble, mais présent à l'état de traces, l'ion nickel prend part à de nombreux systèmes enzymatiques, permettant aux bactéries de survivre et proliférer dans des environnements très divers.

Le nickel, nécessaire mais toxique, est délétère à plusieurs niveaux. Premièrement, de nombreuses enzymes à fer ou à zinc sont inhibées par le nickel. Le nickel est alors responsable d'un défaut de métallation des protéines, par compétition avec le métal d'origine. Il perturbe alors la fonctionnalité catalytique de ces dernières. C'est le cas chez *E. coli* où le nickel est toxique par substitution du zinc dans la Fructose-1,6-diphosphate aldolase. La bactérie devient alors incapable de croître sur milieu contenant du glucose ou du fructose (Macomber *et al*, 2011). Le nickel peut aussi se coordonner dans le centre actif des enzymes possédant une cystéine comme résidu catalytique. C'est le cas par exemple pour les cytosine et uracile-5-méthyltransférases de *E. coli* (Macomber & Hausinger, 2011). Enfin, de manière marginale, le nickel exerce ses effets par promotion du stress oxydatif. Bien que la capacité du nickel à générer des ROS soit moindre comparée au fer ou au cuivre, il est démontré que des bactéries intoxiquées avec du nickel présentent une concentration en ion superoxyde élevée et que le nickel induit l'expression de la superoxyde dismutase chez *Burckholderia* sp. (Van Nostrand *et al*, 2008). Cette capacité est décuplée lorsque le nickel est lié aux cystéines ou à l'histidine (Joshi *et al*, 2005). Un contrôle fin de l'homéostasie du nickel doit donc être mis en place par les bactéries afin de se prémunir des effets délétères de ce métal.

1.3.3. Les enzymes à nickel chez les bactéries

Le nickel est un microélément essentiel pour les bactéries. A l'instar des autres métaux de transition, il prend part entre autres à des réactions d'oxydoréduction, impliquées dans des processus cellulaires variés (Hausinger, 1987). A ce jour, 8 enzymes à nickel ont été identifiées dans le monde bactérien (Tableau 2).

Enzyme	Réaction
Acireductone dioxygénase	$1,2\text{-Dihydroxy-3-oxo-5-(méthylthio)pent-1-ene} + \text{O}_2 \rightarrow \text{HCOOH} + \text{méthylpropionate} + \text{CO}$
Glyoxalase I	$\text{méthylglyoxal} \rightarrow \text{lactate} + \text{H}_2\text{O}$
Superoxyde dismutase à nickel	$2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Hydrogénase à nickel-fer	$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$
Uréase	$\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{CO}_3$
CO Déshydrogénase	$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$
Acétyl-CoA Synthétase	$\text{CH}_3\text{-CFeSP} + \text{CoASH} + \text{CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{-CO-SCoA} + \text{CFeSP}$
Méthyl-CoM réductase	$\text{CH}_3\text{-CoM} + \text{CoBSH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CoM-SS-CoB}$

Tableau 2 Enzymes utilisant le nickel comme cofacteur métallique et réactions chimiques associées

Le nickel est coordonné dans les enzymes selon plusieurs conformations : planes, tétragonique pyramidale ou octaédrique allongée (figure 18). Les résidus histidine, glutamate, aspartate et cystéine jouent un rôle prépondérant dans la coordination du nickel au niveau du site actif. Le nickel peut aussi être coordonné avec d'autres métaux comme le fer au sein de centres à [Fe-S].

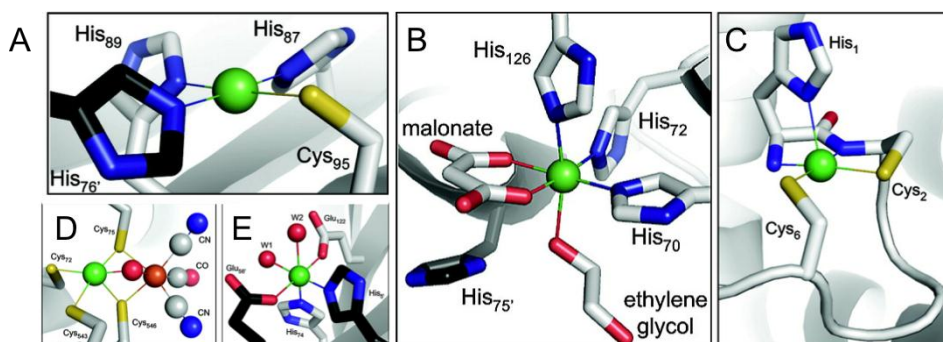


Figure 18 Sites de coordination du nickel

Sites de fixation du nickel de différentes protéines et configuration du nickel dans le centre actif. Configuration plane : (A), Métallorégulateur NikR de *E. coli*. Configuration octaédrique allongée : (B), Métallorégulateur Nur de *Streptomyces coelicolor*; (E), Glyoxalase I de *E. coli*. Configuration tétragonique pyramidale : (C), Superoxyde dismutase à nickel de *Streptomyces coelicolor*; (D), Hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans*. Couleur des atomes : vert, nickel ; bleu, azote ; rouge, oxygène ; jaune, soufre ; orange, fer. Figure adaptée de (Li & Zamble, 2009b).

Notons aussi que le nickel peut être incorporé dans les enzymes, lié à un noyau tétrapyrrole comme c'est le cas pour la Méthyl-CoM réductase (Li & Zamble, 2009b).

2. Les enzymes contenant du nickel chez *H. pylori*

2.1. L'uréase

2.1.1. Caractéristiques structurales et catalytiques

L'uréase est une métalloenzyme à nickel constituée d'un hétérodimère de sous-unité UreA et UreB. Les dimères s'associent ensuite pour former un hétérododécamère $[(\text{UreA-UreB})_3]_4$ de 1,1 MDa constituant l'apoenzyme (Figure 19) (Ha *et al*, 2001). L'insertion du nickel dans le centre catalytique binucléaire du complexe requiert l'intervention de protéines accessoires, UreE à UreH. Deux ions Ni^{2+} vont être coordonnés par sous-unité UreB. En conséquence, 24 ions nickel sont nécessaires au fonctionnement de chaque molécule de complexe actif (Ha *et al*, 2001).

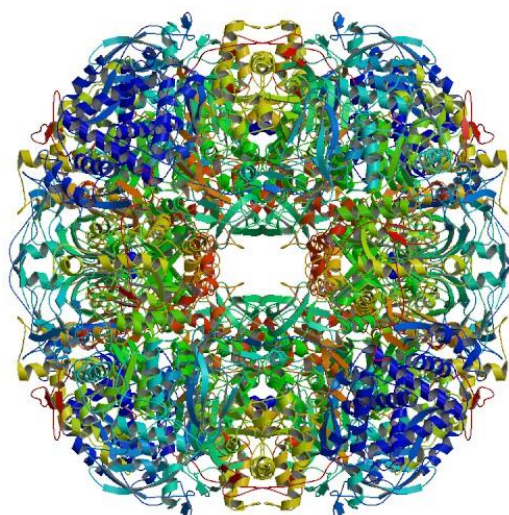


Figure 19 Diagramme en hélices de l'uréase de *H. pylori*

Chaque couleur représente un monomère de UreA ou UreB au sein du complexe $[\text{UreA-UreB}]_3$. La figure représente l'assemblage de 4 complexes $[\text{UreA-UreB}]_3$ formant le dodécamère actif. D'après (Ha *et al*, 2001). Figure issue de (RCSB, 2001).

L'uréase de *H. pylori* est très proche de l'uréase de *Klebsiella aerogenes*. Cependant, l'organisation génétique de l'uréase de *H. pylori* diffère. En dépit de différences notables dans les structures quaternaires de ces deux enzymes, les séquences protéiques et la configuration des centres catalytiques se révèlent largement conservés entre espèces.

Chez *H. pylori*, le centre génétique de l'uréase est composé de deux opérons, l'un comportant pour les gènes de structure *ureA* et *ureB*, l'autre, plus en aval, comportant *ureI* et les gènes codant les protéines accessoires *ureE-H* (Cussac *et al*, 1992). Le gène *ureA* correspond en fait à la fusion des gènes *ureA* et *ureB* de *K. aerogenes* ou *Bacillus pasteurii*,

tandis que le gène *ureB*, codant pour la grande sous-unité structurale, correspond à *ureC* chez ces deux espèces (Figure 20).

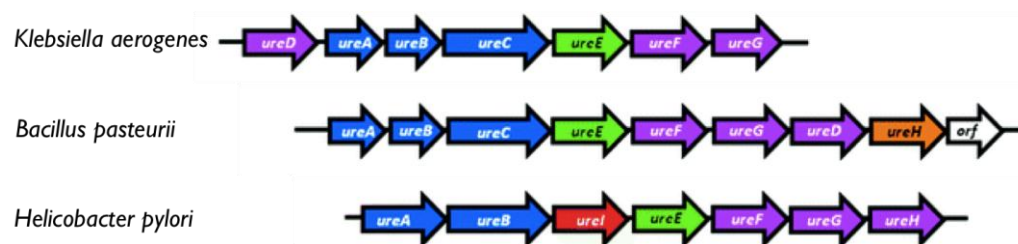


Figure 20 Organisation génétique des uréases de *K. aerogenes*, *B. pasteurii* et *H. pylori*

Code couleur : bleu, sous-unités structurales ; rose, protéines accessoires ; vert, métallochaperonne ; rouge, import de l'urée ; orange, import du nickel. Figure adaptée d'après (Carter *et al*, 2009).

La transcription de l'uréase est activée en réponse au nickel, *via* la métallorégulateur NikR (voir paragraphe 5), et en réponse à l'acidité *via* le système ArsRS. Néanmoins, l'expression basale de l'uréase est importante. Le système ArsRS est constitué d'un senseur membranaire ArsS et d'un régulateur transcriptionnel ArsR. ArsS s'autophosphoryle en réponse à une diminution du pH ; dans un deuxième temps, le groupement phosphate est transféré à ArsR. ArsR activé lie le promoteur des gènes régulés par l'acidité comme *ureA-B* et *ureI*. Pour revue, voir (Zanotti & Cendron, 2010).

L'uréase de *H. pylori* est extrêmement affine pour l'urée, avec un K_m de 170 μM ; c'est l'une des uréases les plus actives jamais décrites. Cette caractéristique lui permet de fonctionner de manière optimale dans l'estomac, où l'urée, issue du sérum, est présente en concentration faible (1,7 à 3,4 mM). La combinaison de ces deux paramètres, ainsi que la synthèse importante de l'uréase, en font une enzyme clé dans le pouvoir de colonisation de *H. pylori* (Mobley *et al*, 1995b).

Dans les uréases à nickel, les deux ions nickel du centre actif sont liés au groupement carboxylate d'une lysine carbamylée et un ion hydroxyde. Les deux ions diffèrent cependant de par leur environnement de coordination (Figure 21).

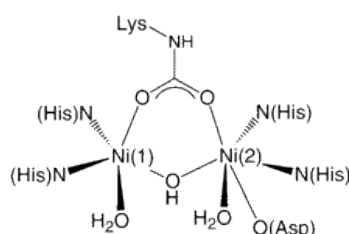


Figure 21 Environnements de coordination du nickel dans l'uréase

Figure issue de (Benini *et al*, 2004).

Le premier ion nickel est coordonné avec deux histidines et une molécule d'eau (NiN_2O_3), tandis que le second est aussi coordonné avec le groupement carboxylate d'un aspartate (NiN_2O_4) (Benini *et al*, 2004).

Le mécanisme catalytique de l'uréase a été étudié chez *K. aerogenes*. Ce mécanisme reste sujet à polémique à cause d'une mauvaise résolution des ligands non protéiques du nickel (eau ou ion hydroxyde), qui ne coïncident pas avec la densité électronique retrouvée dans la structure (Benini *et al*, 1996, 1999). Un mécanisme cohérent a été proposé pour l'uréase de *B. pasteurii*, homologue à celle de *K. aerogenes*.

Selon le même modèle que celui présenté Figure 21, les deux atomes de nickel du centre actif Ni(1) et Ni(2) sont respectivement coordonnés avec les acides aminés ($\text{His}^{\alpha249}$, $\text{His}^{\alpha275}$, $\text{Lys}^{\alpha220}$) et ($\text{His}^{\alpha137}$, $\text{His}^{\alpha139}$, $\text{Asp}^{\alpha363}$, $\text{Lys}^{\alpha220}$). D'autres acides aminés, $\text{His}^{\alpha222}$, $\text{His}^{\alpha323}$, $\text{Ala}^{\alpha170}$ et $\text{Ala}^{\alpha366}$, sont importants pour la catalyse mais ne sont pas impliqués dans la coordination du nickel.

Le mécanisme proposé par Benini *et al*. implique que l'urée lie le Ni(1), le plus électrophile des deux, *via* son atome d'oxygène. Cette liaison est stabilisée par l'état de protonation de $\text{His}^{\alpha222}$, qui agit comme un donneur de liaison hydrogène. Un des groupements amine de l'urée se rapproche alors du Ni(2), conduisant à une liaison du carbamide avec les deux atomes de nickel (Benini *et al*, 1999). On assiste alors à un changement de conformation du centre catalytique, conduisant à une rotation de $\text{Ala}^{\alpha326}$ dont l'atome d'oxygène va pointer vers le Ni(2). Les groupements carbonyle $\text{Ala}^{\alpha170}$ et $\text{Ala}^{\alpha366}$ sont alors en position idéale pour agir comme accepteurs de liaisons hydrogène envers le groupement amine de l'urée, liant le Ni(2). De plus, comme l'urée est un ligand peu avide de par le caractère de base de Lewis faible de ses groupements NH_2 , les liaisons établies avec $\text{Ala}^{\alpha170}$ et $\text{Ala}^{\alpha366}$ augmentent la basicité de ces groupements et facilite ainsi la liaison avec le Ni(2). La liaison bidentate de l'urée aux deux atomes de nickel, très électrophiles, conjointement à l'établissement des liaisons hydrogène décrit ci-dessus, active fortement l'urée en polarisant les liaisons $\text{C}=\text{O}$ et $\text{C}-\text{NH}_2$. Cette conformation de liaison du substrat rapproche l'atome de carbone de l'urée et le Ni(1). Le carbone de l'urée génère alors une attaque électrophile sur l'ion hydroxyde coordonné avec le Ni(1), lui-même activé par $\text{Asp}^{\alpha363}$, qui va accroître sa charge négative. $\text{His}^{\alpha222}$ et $\text{His}^{\alpha323}$ interagissent alors avec le produit de transition, lié de manière tétraédrique à la fois au nickel et à l'ion hydroxyde pour stabiliser ses charges. Le proton nécessaire au clivage de la liaison C-N du groupement amine distal est apporté par l'ion hydroxyde dont le pK_a a été abaissé par la liaison C-O. Ce transfert est assisté par le groupement carboxylate de $\text{Asp}^{\alpha363}$. La molécule

d'ammoniac naissante est liée à His^{α323}. Dans l'étape finale, la liaison C-N est rompue, l'ammoniac est expulsé du site actif, aidé par la rotation de His^{α323}. Le carbamate formé est alors chargé négativement et se trouve dans un environnement de liaison défavorable entre le Ni(1) et Asp^{α363}. Aidé par la rotation de Arg^{α329}, il est relargué de la poche catalytique (Figure 22). Instable à pH physiologique, il est clivé en NH₃ et CO₂ avec l'aide d'une molécule d'eau (Benini *et al*, 1999; Carter *et al*, 2009).

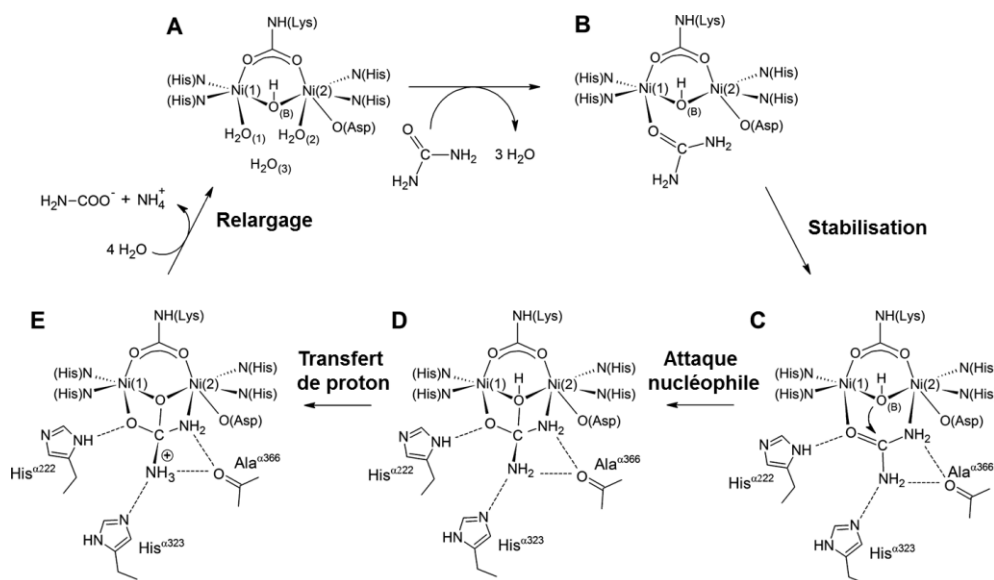


Figure 22 Représentation simplifiée du mécanisme catalytique de l'uréase

Figure adaptée de (Zambelli *et al*, 2011).

2.1.2. Maturation de l'uréase

Comme nous l'avons vu, une coordination correcte des ions nickel dans le centre catalytique est cruciale pour l'activité de l'uréase. L'insertion du nickel dans l'apo-uréase requiert l'intervention concertée de protéines de maturation, dites accessoires. Il a été montré chez *H. pylori* qu'une voie de maturation correcte de l'uréase est nécessaire à l'activité de l'uréase. En effet des mutants de *ureE*, *ureF*, *ureG* ou *ureH* présentent une perte d'activité drastique de l'uréase. De plus, l'ajout de nickel en excès ne suffit pas à restaurer l'activité de l'enzyme chez les mutants *ureE* ou *ureG* (Maier *et al*, 2007).

Chez *K. aerogenes* UreE fixe 6 atomes de nickel, notamment par sa région C_{ter} comportant 10 résidus histidine, et est définie comme une chaperonne à nickel (Grossoehme *et al*, 2007). Chez *H. pylori* UreE est une protéine dimérique capable de lier un ion nickel. La protéine possède un seul résidu histidine conservé, impliqué dans la liaison du nickel chez *K. aerogenes* ou *B. pasteurii*. La structure cristallographique de la protéine de *H. pylori* a permis de mettre en évidence le rôle crucial de His¹⁰² dans la liaison du nickel, comme attendu, mais aussi du zinc

(Figure 23) (Banaszak *et al*, 2012). La fusion C_{ter} d'une extension poly-histidine à la protéine UreE de *H. pylori* conduit à une augmentation artificielle de la capacité de liaison du nickel à la protéine et de l'activité uréasique. Ces expériences démontrent la corrélation entre la capacité de liaison du nickel à UreE et l'activation de l'uréase (Benoit & Maier, 2003; Shi *et al*, 2010).

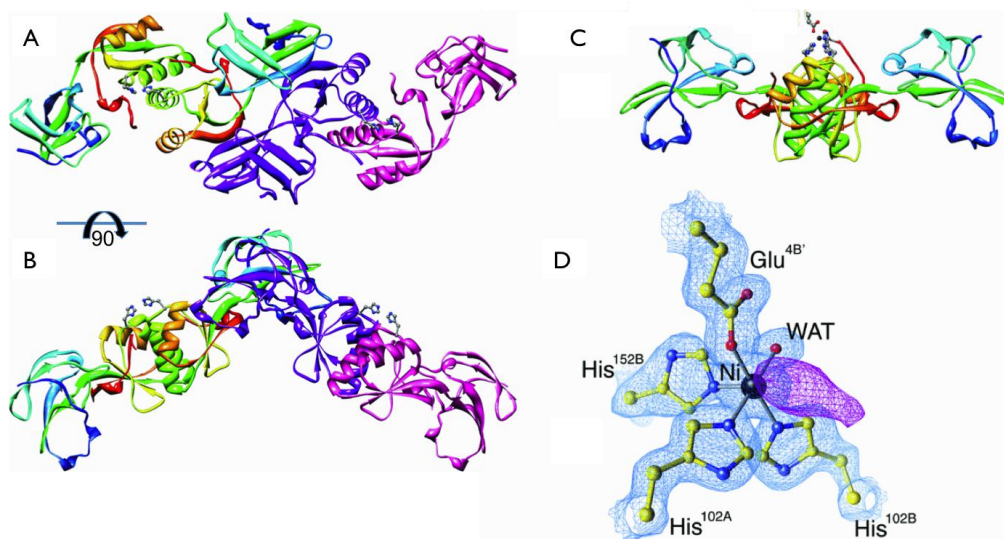


Figure 23 Structure cristalline de la protéine UreE de *H. pylori*

A : diagramme en hélices du dimère de dimères UreE sous sa forme apo. B : même figure avec le complexe retourné de 90° le long de l'axe horizontal. Les histidines 102 sont explicitées dans la structure. C : Dimère de UreE lié au nickel. D : environnement de coordination autour de l'ion nickel fixé par UreE. La densité électronique résultant de l'analyse par diffraction des rayons X est indiquée autour de la molécule en bleu clair et violet. Figure adaptée de (Banaszak *et al*, 2012).

UreG est une GTPase dont le rôle est critique dans l'activation de l'uréase, puisque la mutation du domaine conservé *P-loop* de la protéine conduit à une inactivation de l'uréase *in vitro*. L'inhibition est également observée quand le milieu réactionnel est supplémenté avec du GTP non hydrolysable. L'activité d'hydrolyse du GTP de la protéine est faible *in vitro*, et son rôle dans le processus de maturation demeure obscur. L'activité GTPase est cependant plus importante en présence de UreE, et pourrait être significative *in vivo*. L'énergie provenant de l'hydrolyse du GTP pourrait servir à transférer le nickel d'une protéine à une autre, ou aider à la dissociation des deux protéines. De plus, le complexe UreE/UreG de *H. pylori* est stabilisé par le zinc *in vitro*, métal que peut fixer UreE (Figure 22) (Bellucci *et al*, 2009). Enfin, il a été proposé que UreG puisse carbamyle la lysine qui coordonne les ions nickel à la suite de l'hydrolyse du GTP (Soriano & Hausinger, 1999; Mehta *et al*, 2003; Banaszak *et al*, 2012).

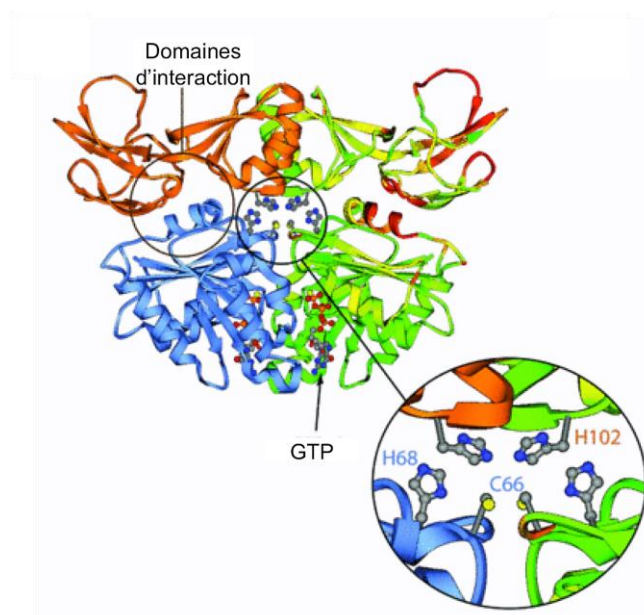


Figure 24 Structure cristalline du complexe UreE/UreG de *H. pylori*

Code couleur : orange, UreE ; bleu, UreG. En regard sont représentées les sous-unités homologues et le gradient de couleur détermine la résolution du complexe de 0 en vert à 1,5 Å en rouge. Les résidus impliqués dans la coordination du nickel sont grossis dans le cercle. Figure adaptée de (Bellucci *et al*, 2009).

UreF et UreH de *H. pylori* ont été cocrystallisées récemment (Fong *et al*, 2011). La structure résolue a mis en évidence un complexe [(UreF-UreH)₂]₂. UreF est une protéine dont la surface d'interaction va permettre l'échafaudage des autres éléments du complexe de préactivation (Lam *et al*, 2010). Pour former ce complexe, la région C_{ter} de UreF est cruciale. Une fois l'interaction établie entre UreF et UreH, cette région en hélice α est soumise à un changement conformationnel. Suite à ce changement, UreG se fixe au complexe pour former une structure hétérotrimérique absolument nécessaire à l'activation de l'uréase (Fong *et al*, 2011).

La maturation de l'uréase représente une étape supplémentaire sur laquelle pourra s'exercer un contrôle de l'activité enzymatique. Conjointement à la régulation transcriptionnelle de l'enzyme, du contrôle de la disponibilité du substrat par l'acidité, l'incorporation du nickel dans l'uréase permet une régulation fine de cette enzyme, dont l'abondance et l'activité élevée font courir le risque d'une intoxication par l'ammoniac à *H. pylori*.

2.2. L'hydrogénase à [NiFe] de *H. pylori*

2.2.1. Généralités

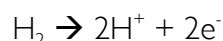
Chez l'hôte, l'hydrogène H₂ est produit par les microorganismes présents dans le colon, en majorité par les bactéries du genre *Clostridium*. Il résulte de la fermentation des sucres

complexes non assimilables par l'hôte comme la pectine (Chinda *et al*, 2004). L'hydrogène produit diffuse facilement de l'intestin jusque dans la circulation sanguine ; environ 20% vont être expirés *via* les poumons. La concentration en hydrogène dans le tissu stomacal est comprise entre 27 et 59 μM . *H. pylori* présente la particularité de respirer, en oxydant le formate, le lactate et le succinate, plus que le glucose et les autres sucres ; *H. pylori* possède un cycle de Krebs incomplet, et, compte tenu de sa niche et du caractère microaérophile de la bactérie, il a été proposé que la quantité d'oxygène utilisée est insuffisante pour complètement oxyder les sucres (Benoit & Maier, 2008).

L'oxydation de l'hydrogène, conduisant à la réduction des cytochromes membranaires, indique que *H. pylori* peut respirer grâce à l'hydrogène, et cette voie énergétique va donc être un pourvoyeur d'ATP important (Maier *et al*, 2003). Des études montrent d'ailleurs que l'import d'acides aminés est plus important quand les cellules sont uniquement en présence d'hydrogène. Cette observation indique que l'oxydation de l'hydrogène est importante en cas de limitation en nutriments, notamment quand la bactérie est majoritairement dépendante des acides aminés pour se procurer des substrats carbonés (Benoit & Maier, 2008).

Pour utiliser l'hydrogène moléculaire comme substrat respiratoire, *H. pylori* possède une unique hydrogénase à [Ni-Fe], importante pour la colonisation, puisque les souches de *H. pylori* qui en sont dépourvues présentent un important défaut de colonisation (Olson & Maier, 2002).

Contrairement aux hydrogénases des autres organismes dont l'activité est souvent réversible, l'hydrogénase de *H. pylori* catalyse uniquement la réaction suivante (Schmitt & Haas, 1994) :



Les électrons produits sont transférés au cytochrome *b* qui sert d'intermédiaire à leur passage dans la chaîne de transport des électrons.

L'hydrogénase à [NiFe] est organisée en complexe hétérotrimérique. Le gène *hydA* code pour la petite sous-unité (α), *hydB* pour la grande sous-unité (β) et *hydC* pour le cytochrome *b* ancré à la membrane (γ). L'enzyme est sécrétée dans le périplasme *via* le système *Twin Arginine Translocation* (TAT) où elle est pleinement active, ancrée à la membrane par le cytochrome *b*.

La structure de l'hydrogénase à [NiFe] de *H. pylori* n'a pas encore été résolue. Par analogie avec l'hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans*, on pense que la sous-unité β contiendrait trois centres [Fe-S] tandis que la sous-unité α contiendrait un centre catalytique binucléaire à fer et à nickel (Figure 25).

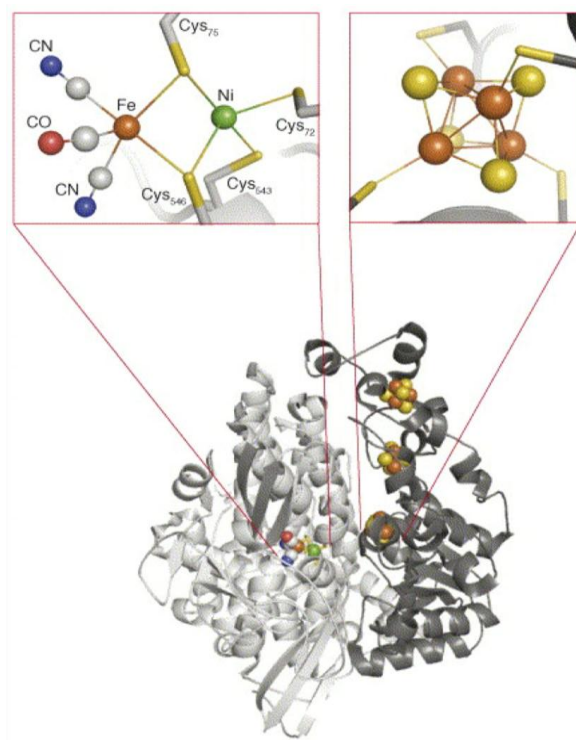


Figure 25 Structure de l'hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans*

Le centre catalytique à Nickel-Fer de la sous-unité α (gris) est agrandi dans le cadre de gauche pour dévoiler son environnement de coordination, tandis que l'agrandissement d'un centre [Fe-S] de la sous-unité β (noire) est représenté dans le cadre de droite. Code couleur : jaune, soufre ; orange, fer ; vert, nickel ; bleu, azote ; rouge, oxygène ; gris, carbone. Figure issue de (Leach & Zamble, 2007).

2.2.2. Maturation de l'hydrogénase à [NiFe]

Les hydrogénases à Nickel-Fer constituent les enzymes dont la maturation du centre catalytique est la plus complexe à ce jour. Comme pour l'uréase, l'insertion des cofacteurs métalliques dans l'apo-hydrogénase, et la maturation des centres [Fe-S] nécessite l'action coordonnée de protéines accessoires spécifiques.

2.2.2.1. Insertion des métaux dans le centre actif

Ces protéines accessoires ont été identifiées chez *H. pylori*, il s'agit des protéines Hyp, codées par trois opérons distincts disséminés sur le chromosome : *hypA*, *hypBCD* et *hypEF*. Ces gènes sont conservés chez *E. coli* où ils sont regroupés dans un seul opéron. Le processus de maturation de l'hydrogénase a été peu étudié chez *H. pylori*. Chez *H. pylori*, les protéines HypA et HypB catalysent l'incorporation de l'ion nickel dans l'apo-hydrogénase ; le rôle de HypC-F n'a pas été étudié en détail. Il a été montré que la mutation de HypA-B ou de HypC-F conduit à une diminution drastique de l'activité de l'hydrogénase chez *H. pylori* (Olson *et al*, 2001; Benoit *et al*, 2004).

Le processus de maturation de l'hydrogénase à [NiFe] de *H. pylori* n'est pas connu précisément mais pourrait présenter des similarités avec celui décrit pour l'hydrogénase HydI de *E. coli*. Seules les protéines HypA et HypB ont fait l'objet d'une caractérisation biochimique chez *H. pylori*. HypA est une protéine de forme allongée possédant deux sites de fixation des métaux. Le site de fixation du nickel en N_{ter}, possède un environnement de coordination en plan carré typique qui facilite le transfert du nickel à l'hydrogénase. Chaque monomère de HypA lie deux atomes de nickel. L'autre site, constitué de quatre cystéines conservées, fixe le zinc et a pour rôle de stabiliser la structure de HypA (Figure 26) (Mehta *et al*, 2003; Xia *et al*, 2009).

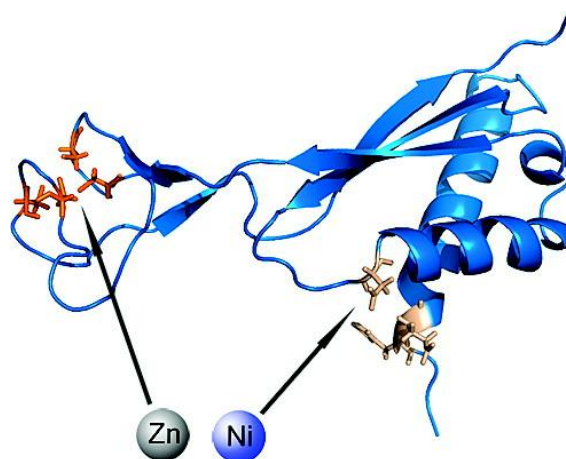


Figure 26 Diagramme en hélices et positionnement des sites de coordination des métaux de HypA de *H. pylori*

Figure issue de (Xia *et al*, 2009).

Chez *H. pylori* HypB est une petite GTPase capable de fixer soit le nickel, soit le zinc. La fixation du nickel sur HypB induit la dimérisation de celle-ci en l'absence d'autre partenaire, ou, son interaction avec HypA. La multimérisation de HypB stimule par ailleurs l'activité GTPase de HypB (Sydor *et al*, 2011; Xia *et al*, 2012).

Chez *E. coli*, l'insertion du cofacteur métallique requiert l'action concertée de SlyD avec HypA et HypB. SlyD, dont la structure a récemment été résolue chez *H. pylori*, est une protéine multi-domaines ayant pour rôle d'assurer un repliement correct des protéines grâce à une activité peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase. De plus, SlyD est capable de fixer les métaux, notamment le nickel ($K_M < 10^{-10}$ M). Cette fixation a lieu dans la région C_{ter} riche en résidus histidine et cystéine (Kaluarachchi *et al*, 2011a; Cheng *et al*, 2012; Witkowska *et al*, 2012b). Chez *E. coli*, où HypB est déficient en domaine poly-histidine de fixation du nickel, SlyD agirait comme un réservoir à nickel, et, en établissant un complexe avec HypAB, permettrait l'insertion du cofacteur dans le centre actif de l'hydrogénase. HypA agirait alors comme une protéine

structurale, permettant l'échafaudage de HypB qui fournirait l'énergie nécessaire à l'incorporation du nickel fourni par SlyD (Chan Chung & Zamble, 2011; Kaluarachchi *et al*, 2011b). Cependant, nous ne savons pas si ces observations obtenues chez *E. coli* sont transposables à l'hydrogénase de *H. pylori*. En effet, une étude récente a démontré que chez *Campylobacter jejuni*, phylogénétiquement proche de *H. pylori*, la maturation de l'hydrogénase est indépendante de SlyD (Howlett *et al*, 2012). Chez *H. pylori*, la maturation de l'hydrogénase à [NiFe] pourrait donc être dépendante d'autres protéines ayant une forte capacité de fixation du nickel. Comme nous le verrons après, *H. pylori* possède plusieurs de ces protéines. Il est proposé que HypA serve de métallochaperonne tandis que HypB, par hydrolyse du GTP, apporte l'énergie nécessaire à l'incorporation du métal dans l'enzyme et la dissociation du complexe HypB/Apo-HypA (Maier *et al*, 2007). Le rôle de SlyD chez *H. pylori* pourrait alors être limité au contrôle qualité du repliement de la protéine avant sa sécrétion, puisque SlyD possède un domaine d'interaction avec le *peptide signal* TAT (Cheng *et al*, 2012). Des expériences sont en cours dans notre laboratoire pour connaître plus précisément le rôle de SlyD chez *H. pylori* et évaluer son importance dans la colonisation du modèle animal.

Les protéines HypE et HypF n'ont pas été étudiées chez *H. pylori*. Chez *E. coli*, le complexe HypEF est impliqué dans la synthèse du ligand cyanidé nécessaire à la coordination de l'atome de fer dans l'hydrogénase. HypF se sert du carbamoyl-phosphate comme substrat pour carbamoyler HypE. Par une activité déshydratase dépendante de l'ATP, HypE produit en retour du thiocyanate qui est incorporé dans le centre catalytique de l'hydrogénase (Blokesch *et al*, 2004b). La voie par laquelle le monoxyde de carbone, autre ligand du fer dans le centre catalytique est synthétisé est moins claire.

Quant au complexe HypCD, il participe au transfert du thiocyanate lié au fer jusque dans l'hydrogénase. Ce transfert implique l'établissement de sous-complexes dynamiques entre ce complexe, HypEF et HydAB (Blokesch *et al*, 2004a).

2.2.2.2. Maturation des centres [Fe-S]

La maturation des centres [Fe-S] est une autre étape critique de la maturation de l'hydrogénase. Les centres [Fe-S] sont capables d'atteindre un très faible potentiel oxydoréducteur, avec des états redox variés et ils sont très sensibles aux stress métalliques et oxygénés. De manière générale, les centres [Fe-S] sont les cofacteurs inorganiques ubiquitaires de nombreuses protéines qui sont impliqués dans le transfert des électrons, la catalyse ou la régulation (Fontecave, 2006; Py & Barras, 2010).

Coordonnés selon une structure rhombique pour les centres [2Fe-2S], ou cubique pour les [4Fe-4S], la biosynthèse du centre ainsi que son assemblage dans l'apoenzyme qui le reçoit nécessite l'action concertée d'un complexe de biosynthèse (Figure 27).

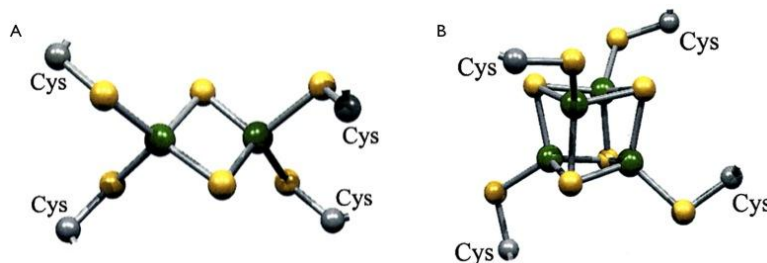


Figure 27 Structure des centres [Fe-S]

(A) : structure rhombique [2Fe-2S] ; (B) : structure cubique [4Fe-4S]. Code couleur : jaune, soufre ; vert, fer. Figure adaptée de (Frazzon & Dean, 2001).

Il existe trois systèmes enzymatiques largement répandus dans le monde vivant qui sont capables d'assurer la biogenèse des centres [Fe-S]. *E. coli* possède deux de ces trois systèmes. Le premier, codé par les gènes *isc*, code pour un régulateur (IscR), une cystéine désulfurase (IscS), une protéine architecte ou *scaffold* (IscU), une protéine de type A (IscA), une chaperonne de la famille DnaJ (HscB), une chaperonne de la famille DnaK et une ferrédoxine (Fdx) (Tokumoto & Takahashi, 2001). L'autre système est codé par l'opéron *suf* et code pour une protéine de type A (SufA), une cystéine désulfurase hétérodimérique (SufSE) et un pseudo ABC transporteur qui servirait de protéine *scaffold* (SufBCD) (Figure 28) (Outten *et al*, 2004; Loiseau *et al*, 2003). Enfin, un troisième système, dédié à la maturation de la nitrogénase chez les organismes fixant l'azote est assuré par les gènes *nifU* et *nifS*, codant respectivement pour une pyridoxal phosphate cystéine désulfurase, et une protéine architecte (Takahashi & Tokumoto, 2002). Pour une revue, voir (Py & Barras, 2010).

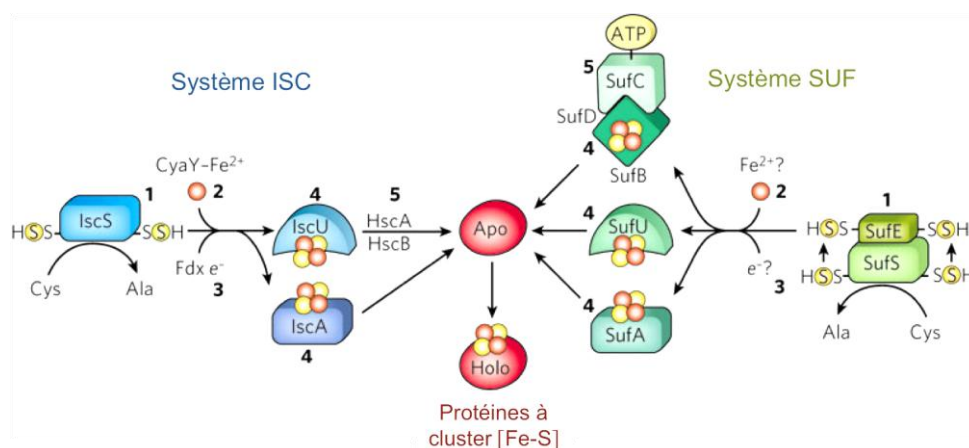


Figure 28 Mécanismes de biosynthèse des centres [Fe-S]

Utilisation des systèmes Isc et Suf pour la biosynthèse des centres [Fe-S] chez les bactéries. CyaY, protéine fixant le fer ; Fdx, ferrédoxine ; HscAB, protéines chaperonnes. Figure adaptée de (Lill, 2009).

H. pylori, comme *Campylobacter jejuni*, possède uniquement un opéron *nif*. A cause de la spécificité de NifU et NifS pour la nitrogénase, enzyme absente chez ces bactéries, et en l'absence d'opérons *isc* et *suf*, la question de la biogenèse des centres [Fe-S] chez les ϵ -*Proteobacteria* est intrigante. Et ce d'autant plus que NifSU est décrit pour être actif uniquement en anaérobiose (Olson *et al*, 2000). NifS est homologue à IscS et SufS et présente une activité de cystéine désulfurase. Quant à NifA elle peut être divisée en deux domaines ; le domaine N_{ter} est similaire à IscU, le domaine C_{ter}, possède trois résidus cystéine conservés avec IscA, importants pour la fonction d'échafaudage du centre [Fe-S] naissant. Il a été montré que l'opéron *nif* de *H. pylori* était capable de compléter la délétion des opérons *isc* et *suf* chez *E. coli*, et ce, de manière intéressante, sans le concours de protéines comme HscA ou B, hydrolysant l'ATP. Cette démonstration apporte la preuve de la polyvalence du système NifSU de *H. pylori* pour la maturation des centres [Fe-S] (Tokumoto *et al*, 2004).

2.2.2.3. Voies communes de maturation de l'hydrogénase et de l'uréase

Comme nous l'avons mentionné précédemment, une interconnexion physique entre les voies de maturation de l'hydrogénase et de l'uréase a été apportée par l'étude en TAP de Stingl *et al*. (Stingl *et al*, 2008). Une étude génétique avait au préalable montré le chevauchement des voies de maturation des deux enzymes à nickel chez *H. pylori*. En effet, quand les auteurs ont muté HypA dans son site de fixation du nickel, ils ont observé une perte quasi-totale des activités de l'uréase et de l'hydrogénase (Mehta *et al*, 2003).

Ces observations vont dans le sens d'une machinerie unique et interconnectée des protéines de maturation des enzymes à nickel chez *H. pylori*.

Plus largement, *Stingl et al.* ont observé dans leur étude en TAP une interaction entre le système Nif et la machinerie de maturation de l'hydrogénase (*Stingl et al.*, 2008). On peut donc proposer que tout le processus de maturation des centres actifs à métaux de l'uréase et de l'hydrogénase, et pas seulement la coordination du nickel dans le site catalytique, soit couplés chez *H. pylori*.

Un tel mécanisme pourrait conduire à une plus grande réactivité en mettant des complexes de maturation préformés à disposition des enzymes néosynthétisées, permettant ainsi d'optimiser la métallation de l'une ou l'autre des protéines, ou de réguler la distribution du nickel entre les deux enzymes par un mécanisme encore inconnu.

3. Gestion des flux de nickel chez *H. pylori*

Pour que le nickel puisse être inséré dans les enzymes cytoplasmiques, il doit être transporté au travers des membranes externes et cytoplasmiques. Cependant, cette entrée doit se faire de manière régulée afin d'éviter les effets délétères de l'accumulation excessive du métal. Les bactéries dépendantes du nickel ont donc développé des systèmes d'acquisition sophistiqués similaires à ceux utilisés pour importer le fer et doivent assurer un contrôle très strict de la concentration intracellulaire en nickel.

3.1. Importation du nickel au travers de la membrane cytoplasmique

3.1.1. Transporteurs ATP-dépendants

Chez *E. coli*, dépendante du nickel pour le fonctionnement de ses hydrogénases, ainsi que chez *Brucella suis* ou encore *Vibrio parahemolyticus*, un transporteur de type ABC NikABCDE permet au nickel de traverser la membrane cytoplasmique (Li & Zamble, 2009b).

Chez *E. coli*, l'opéron *nik*, codant NikABCDE est induit en anaérobiose et est strictement requis pour assurer l'activité hydrogénase. Structuralement, les protéines NikB et NikC forment un canal transmembranaire alors que NikD et NikE forment le domaine cytoplasmique d'hydrolyse de l'ATP. NikA sert de protéine de liaison du nickel dans le périplasma. Le nickel est ensuite transporté par NikDE (Navarro *et al.*, 1993). Christine Cavazza, à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, a déterminé la structure tridimensionnelle de NikA et observé que NikA ne lie pas directement le nickel, mais par l'intermédiaire d'une molécule organique

tricarboxylée qu'elle a nommée *nickelophore* par analogie aux sidérophores. L'hypothèse est que cette molécule servirait de chélateur à nickel dans le milieu extérieur. La nature précise de ce nickelophore et sa voie de biosynthèse restent pour le moment inconnus (Cavazza *et al*, 2011). Chez *H. pylori*, l'opéron *dpp* présente entre 40 et 56% d'homologie avec *Ec-nikABCDE*. Cependant, la délétion de l'opéron *dpp* n'a aucune influence sur le transport du nickel chez *H. pylori* et son rôle *in vivo* est inconnu (Davis & Mobley, 2005).

Une nouvelle famille de transporteurs de cobalt et nickel de type ABC a été décrite chez *Salmonella enterica* sv *typhimurium*. Elle a la particularité d'être déficiente en protéine périplasmique de liaison du métal. Cette famille est largement répandue chez les procaryotes ; pour le nickel, il s'agit du système NikMNQO. Ni ce système, ni NikABCDE n'ont d'homologues chez *H. pylori* (Rodionov *et al*, 2006).

3.1.2. Transporteur protons-dépendant : NixA

Les transporteurs de la famille NiCoT, dont le prototype a été identifié chez *Ralstonia metallidurans*, utilisent la force proton motrice transmembranaire comme source d'énergie pour transporter le nickel et le cobalt au travers de la membrane interne (Degen *et al*, 1999). Chez *H. pylori*, la protéine NixA appartient à la famille des transporteurs de type NiCoT. Il s'agit d'une protéine intégrale de membrane interne de 32 kDa qui contient huit segments transmembranaires. Son affinité pour le nickel est très élevée ($K_d = 11, 4 \text{ nM}$). En revanche, la vitesse de transport est faible ; ce transporteur est donc de haute affinité mais de faible capacité pour le transport du nickel (Mobley *et al*, 1995a; Bauerfeind *et al*, 1996; Fulkerson & Mobley, 2000). La mutation de ce transporteur chez *H. pylori* conduit à une inhibition du transport du nickel et une diminution de l'activité uréasique, tandis que la résistance aux excès de nickel est accrue. De plus, des expériences de transport du nickel radioactif ont confirmé le rôle de NixA comme transporteur de membrane interne du nickel (Bauerfeind *et al*, 1996; Mobley *et al*, 1999).

Malgré le rôle important de NixA comme transporteur de nickel, le mutant n'est pas affecté dans la colonisation et conserve 50% de son activité uréasique en milieu non supplémenté en nickel (Nolan *et al*, 2002; Bauerfeind *et al*, 1996). Ces observations suggèrent l'existence d'autres transporteurs de membrane interne impliqués dans le transport du nickel.

3.1.3. Transport au travers de la membrane externe

Il est largement admis que les solutés de bas poids moléculaire traversent la membrane externe des bactéries à Gram négatif au travers de porines, en fonction du gradient de

concentration. Un transport de haute affinité de molécules insolubles ou peu abondantes au travers de la membrane externe s'effectue par des TBDT ; les sidérophores sont transportés par ce système. Le nickel étant un composé présent à l'état de traces dans le corps humain, notre unité a cherché à savoir si ce type de transport avait lieu pour l'ion Ni^{2+} .

Chez *H. pylori*, il existe un opéron *tonB/ExbB/ExbD* dont l'expression est activée par le fer et le nickel au travers des régulateurs transcriptionnels Fur et NikR, respectivement (Delany *et al*, 2005). Parallèlement, les gènes *fecA3*, *FrpB4* et *ceuE1*, codant pour des transporteurs de membrane externe interagissant avec le système TonB/ExbB/ExbD sont uniquement régulés par le nickel (Contreras *et al*, 2003). Ces résultats indiquent un possible recouvrement des voies d'acquisition de haute efficacité du fer et du nickel chez *H. pylori*.

Dans notre laboratoire, Schauer *et al*. ont montré que la machinerie TonB/ExbB/ExbD est importante pour l'acquisition du fer à pH neutre et du nickel à pH acide. De plus, l'exposition d'une souche sauvage de *H. pylori* à des concentrations croissantes de nickel montre une forte répression de la synthèse de ExbB, confirmant la régulation de cette machinerie par le nickel, et donc, ayant éventuellement un rôle dans le transport du nickel (Schauer *et al*, 2007).

La protéine de membrane externe FrpB4 de *H. pylori* possède toutes les caractéristiques structurales des protéines de TBDT. Dans notre laboratoire, Schauer *et al*. ont montré que FrpB4 est un TBDT et que, initialement annoté comme transporteur du fer, sa régulation est uniquement dépendante du nickel. La délétion du gène codant cette protéine conduit chez *H. pylori* à une inhibition de l'accumulation du nickel à l'intérieur de la cellule à pH acide qui est corrélée à une inhibition du transport du nickel radioactif quand celui-ci est en faible concentration. Ces observations sont corrélées à une diminution de l'activité uréasique en milieu non supplémenté en nickel (Schauer *et al*, 2007).

Parallèlement, la délétion du système TonB/ExbB/ExbD a un impact sur le transport du fer. A pH acide la majorité du fer se trouve sous forme (II), soluble, et peut donc diffuser par les porines. Les souches mutées deviennent alors résistantes aux excès de fer et sont dépendantes d'une importante supplémentation du milieu en fer pour leur croissance à pH neutre. La supplémentation en fer, quelle que soit son origine (citrate de fer, lactoferrine humaine, hémoglobine) est capable de restaurer le phénotype de croissance d'une souche sauvage. La restauration du phénotype sauvage est indépendante de FrpB4 ce qui indique que cette protéine est uniquement dévolue à l'import du nickel en conditions limitantes (Schauer *et al*, 2007). FrpB4 est donc le premier transporteur de type TBDT décrit à être spécialisé dans le transport du nickel à faibles concentrations.

Les sidérophores fixant le fer sont des molécules de haute affinité prises en charge par les transporteurs TonB dépendants. Chez *H. pylori* l'hypothèse d'un nickelophore agissant selon les mêmes modalités que les sidérophores est attractive. En absence de données de structures sur FrpB4, on ne sait pas si ce transporteur reconnaît le nickel seul ou complexé à un ligand de type nickelophore. Un nickelophore potentiel pourrait être soit synthétisé par la bactérie, soit provenir du milieu extérieur. Un crible génétique est actuellement en cours dans notre laboratoire pour identifier les gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'un nickelophore.

3.2. Efflux

Une pompe d'efflux homologue au système initialement identifié chez *Ralstonia eutropha*, et largement distribuée, a été décrite chez *H. pylori*. Il s'agit d'une pompe d'efflux généralement impliquée dans la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques, et qui utilise la force proton motrice pour expulser les composés toxiques hors du cytoplasme (Nies, 2003).

Chez *H. pylori*, ce système est codé par l'opéron *cznABC*. CznA constitue la protéine structurale de la pompe conférant la spécificité de substrat et fonctionnant comme un antipore à cations protons dépendant. CznB est une protéine périplasmique d'ancrage du système à la membrane. Enfin, CznC est un homologue de la protéine d'efflux membranaire TolC. Ce système confère à *H. pylori* la capacité de résister aux très fortes concentrations en cadmium, zinc et nickel. De plus, la délétion de *cznA* et *cznC* induit une augmentation de l'activité uréasique cohérente avec une augmentation du nickel intracellulaire (Stähler *et al*, 2006). Enfin, les mutants du système CznABC sont incapables de coloniser l'estomac du modèle murin, démontrant le rôle *in vivo* d'un tel mécanisme de résistance aux excès de nickel. Cette déficience dans la colonisation s'explique probablement par l'augmentation de l'activité uréasique. En effet, malgré un système d'acquisition aussi affin que celui de *H. pylori*, il est peu probable que les conditions dans l'hôte soient suffisamment favorables pour que la bactérie subisse un excès d'import de nickel.

3.3. Protéines fixant le nickel

Nous avons vu que le fer peut être stocké dans les ferritines qui constituent un réservoir intracellulaire, tout en maintenant le fer hors d'état d'exercer ses effets délétères. Chez *E. coli*, il a été proposé que SlyD et HypB puissent servir de réservoir à nickel. Cependant, chez *H. pylori*, HypB ne contient pas de motif C_{ter} de fixation du nickel et SlyD n'a aucun rôle connu. On peut donc supposer que d'autres protéines assurent le stockage du nickel.

3.3.1. Différentes protéines de fixation du nickel chez *H. pylori*

Le nickel est un élément central de la physiologie de *H. pylori*. En tant que cofacteur dans l'uréase et l'hydrogénase, il nécessite d'être pris en charge par une batterie de protéines impliquées dans la maturation de ces enzymes. Cependant, de manière analogue au fer, le nickel doit pouvoir être complexé et stocké, à but de réserve, tout en prémunissant la cellule de ses effets délétères. *H. pylori* possède plusieurs protéines capables de fixer le nickel. Une de leurs caractéristiques est leur richesse en résidus histidine. A l'heure actuelle, la littérature ne mentionne que quelques protéines riches en histidine. On peut citer l'Histidine-Proline-Rich-Glycoprotein humaine synthétisée par le foie et qui est un inhibiteur de l'angiogenèse. Cette protéine constituée de 13% de résidus histidine a pour fonction de lier le zinc (Jones *et al*, 2005). Chez *Plasmodium falciparum*, il existe trois protéines à 35% riches en histidine. Elles sont sécrétées par *P. falciparum* dans l'érythrocyte et servent à détoxifier les composés toxiques dus à la dégradation de l'hémoglobine par le parasite (Papalexis *et al*, 2001; Akompong *et al*, 2002). Les peptides antimicrobiens se caractérisent aussi par leur richesse en histidine (Wiesner & Vilcinskas, 2010).

Chez les bactéries, les protéines riches en histidine sont rares et correspondent généralement aux protéines accessoires des enzymes à nickel. A titre d'exemple nous pouvons citer la protéine CooJ de *Rhodospirillum rubrum* qui participe au fonctionnement de la CO déshydrogénase. CooJ contient 50% de résidus histidine dans sa région C_{ter} et fixe le nickel, deux caractéristiques qui lui confèrent des propriétés similaires à la protéine UreE de *K. aerogenes* (Watt & Ludden, 1998). La protéine Whp de *E. coli*, ayant un orthologue chez *Pseudomonas fluorescens*, a des homologies de séquence avec les cyclophilines eucaryotes. Elle se caractérise par un domaine C_{ter} de fixation aux métaux contenant 30% de résidus histidine. Cette protéine lie les métaux et notamment le nickel et le zinc avec une haute affinité. Le rôle de cette protéine est à ce jour inconnu chez *E. coli* (Wülfing *et al*, 1994).

3.3.2. HspA, une protéine multifonctionnelle

HspA (*Heat Shock Protein A*) est une chaperonne, homologue à la protéine GroES (Suerbaum *et al*, 1994). GroES est une protéine essentielle largement conservée parmi les génomes procaryotes et eucaryotes. Elle constitue la co-chaperonne du complexe GroES/GroEL, complexe en forme de tonneau dont le rôle est d'assurer un repliement tridimensionnel correct des protéines (Figure 29) (Radford, 2006).

HspA possède de plus une extension C_{ter} non structurée de 27 acides aminés, riche en résidus histidine (8/27) et cystéine (4/27), comprenant le motif HX_4DH , identifié comme impliqué dans la fixation du nickel (Eitinger *et al*, 2005). Cette extension est unique à *H. pylori* et aux deux espèces les plus proches phylogénétiquement, *Helicobacter acinonychis* et *Helicobacter ceterum* ; elle n'est pas conservée dans les autres espèces bactériennes (Suerbaum *et al*, 1994).

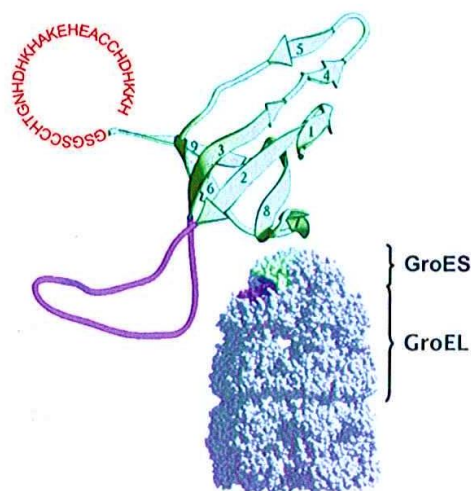


Figure 29 Structure du complexe GroES/GroEL et diagramme de GroES avec mise en évidence de l'extension C_{ter} de HspA

Figure issue de (Schauer, 2007).

L'étude de la protéine HspA de *H. pylori* dans notre laboratoire, a permis de montrer que les mutants délétés de l'extension fixant le nickel étaient plus sensibles aux excès de nickel et présentaient une concentration intracellulaire en nickel diminuée (Schauer *et al*, 2010). Ces résultats indiquent donc clairement une implication de HspA dans le stockage et la séquestration du nickel.

Initialement, HspA avait été proposée comme étant une chaperonne de l'uréase. En effet, chez *E. coli*, l'expression combinée de HspA et de l'uréase de *H. pylori* conduisait à une augmentation de l'activité uréasique (Suerbaum *et al*, 1994; Kansau *et al*, 1996). Chez *H. pylori*, cette observation n'a pas été confirmée. En revanche, la délétion de HspA, de son extension C_{ter} ou la mutation des résidus impliqués dans la fixation du nickel, conduit à une très forte diminution de l'activité de l'hydrogénase à [NiFe] en absence de supplémentation en nickel, alors que l'activité de l'uréase est inchangée (Schauer *et al*, 2010). HspA est donc une protéine de séquestration du nickel pour l'hydrogénase, dont le mode d'action précis reste à déterminer.

3.3.3. Hpn et Hpn-2

H. pylori possède également deux autres protéines riches en histidine : Hpn et Hpn-2. Ces protéines ont été caractérisées *in vitro* pour leur capacité à fixer le nickel.

Hpn est une petite protéine de 60 acides aminés (7 kDa) comprenant 28 résidus histidine et 4 résidus cystéine (Gilbert *et al*, 1995; Mobley *et al*, 1999). Ces 4 résidus permettent une stabilisation de la liaison des cations métalliques divalents (Ni^{2+} , Bi^{3+} , Zn^{2+}) et les liaisons les plus fortes sont établies avec le bismuth, puis le nickel (Rowinska-Zyrek *et al*, 2011). Chaque monomère de Hpn peut fixer 5 ions nickel *in vitro* avec un $K_d = 7,1 \mu\text{M}$ à $\text{pH} = 7,4$. La protéine est très abondante *in vivo* (2% des protéines totales) et son expression en système hétérologue aboutit à des complexes de 7 à 500 kDa, avec une forme prédominante correspondant à un 20-mère. L'expression de Hpn chez *E. coli* augmente la tolérance de la souche aux excès de nickel. On peut supposer que le nickel est alors séquestré par Hpn dans la cellule (Ge *et al*, 2006). Chez *H. pylori*, la délétion de Hpn conduit à une moindre résistance au bismuth, au nickel et au cadmium tandis que les sensibilités au zinc et au cobalt sont inchangées (Mobley *et al*, 1999; Seshadri *et al*, 2007).

Hpn-2, initialement appelée Hpn-like, est une protéine partageant 56% d'identité de séquence avec Hpn. Hpn-2 (72 résidus, 8,8 kDa) est composée d'une région N_{ter} riche en résidus histidine (18/72) très similaire à Hpn, et d'une région C_{ter} riche en répétitions de résidus glutamine (30/72). Hpn-2 lie très fortement le nickel *in vitro* ($K_d = 3,8 \mu\text{M}$), indépendamment des résidus glutamine, qui en revanche sont impliqués dans la stabilisation du complexe nickel/histidine (Witkowska *et al*, 2011). A la très forte similitude entre les séquences N_{ter} de Hpn et Hpn-2 (Figure 30) s'ajoute une forte conservation au niveau nucléotidique. Ces deux gènes pourraient être issus d'une duplication ancienne, même si l'hypothèse d'une convergence liée à la forte concentration en acides aminés semblables dans la région est possible (Communication personnelle de Céline Brochier-Armanet).

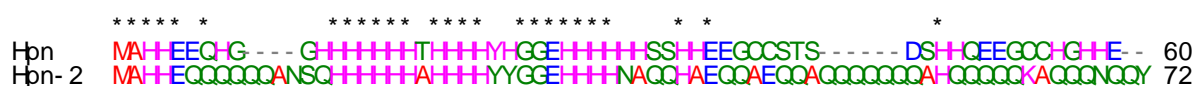


Figure 30 Alignement des séquences protéiques de Hpn et Hpn-2

Séquence des protéines Hpn et Hpn-2 synthétisées par la souche 26695 de *H. pylori* (Tomb *et al*, 1997). Les étoiles indiquent les résidus conservés entre les deux protéines. Code couleur des acides aminés : rouge, petit hydrophobe ; bleu, acide ; rose, basique ; vert, hydroxylé ou sulfhydrylé ou aminé. Alignement réalisé par ClustalW2.

Lorsque Hpn-2 est exprimée chez *E. coli*, elle augmente la tolérance de la bactérie aux concentrations élevées en nickel et sa purification montre une protéine dans un état

d'oligomérisation de 22 sous-unités (201 kDa) (Zeng *et al*, 2008; Witkowska *et al*, 2011). Un article publié par Seshadri *et al*. rapporte que chez *H. pylori* Hpn-2 joue un rôle majeur dans la résistance aux excès de nickel et de cadmium. Les auteurs rapportent aussi qu'un des effets communs de Hpn et Hpn-2 est de limiter l'activité de l'uréase chez *H. pylori*; lorsque les gènes codant pour ces protéines sont mutées, Seshadri *et al*., observent une dérégulation de l'activité uréasique qu'ils expliquent par une plus grande quantité de nickel intracellulaire disponible pour l'uréase (Seshadri *et al*, 2007). Selon ces auteurs, le rôle de Hpn et Hpn-2 serait d'entrer en compétition avec l'uréase en séquestrant le nickel, qui, au vu des propriétés physicochimiques de ces protéines, serait relargué à pH acide et alors incorporé dans l'uréase.

Du point de vue de la régulation, l'expression de Hpn et Hpn-2 est activée par le régulateur transcriptionnel répondant au nickel, NikR, en présence de nickel. De plus Hpn-2 est induit à pH acide (Bury-Moné *et al*, 2004; Muller *et al*, 2011).

Le travail de Ge *et al*., a récemment mis en lumière la capacité de Hpn à former des fibres amyloïdes *in vitro* (Ge *et al*, 2011). De telles fibres sont similaires à celles retrouvées en pathologie humaine dans la maladie d'Alzheimer. Dans leur étude, les auteurs démontrent un effet cytotoxique de ces fibres sur les cellules gastriques humaines en culture. De plus, les auteurs émettent l'hypothèse que Hpn puisse être sécrétée et passe la barrière hémato-encéphalique, agissant dans le cerveau comme un potentialisateur de la maladie d'Alzheimer (Ge & Sun, 2011). Une telle hypothèse est basée sur un travail suggérant un lien, non démontré, entre infection à *H. pylori* et développement de la maladie d'Alzheimer (Kountouras *et al*, 2012).

Plus que le rôle de Hpn en pathologie humaine, il est intéressant de noter que les protéines formant des fibres responsables de maladies chez l'homme sont généralement constituées de répétitions de glutamine qui évoquent Hpn-2 (Ross & Poirier, 2005). De plus, il a été montré que le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer avait une concentration anormalement élevée en métaux (Bush, 2012). S'il est peu probable que des fibres soient présentes *in vivo* dans la cellule de *H. pylori*, l'hypothèse que ces protéines soient sécrétées et puissent constituer un réservoir local de métaux serait une observation inédite dans le monde bactérien (voir la section Discussion et Perspectives de ce travail).

Un maintien correct de l'homéostasie du nickel est crucial pour *H. pylori*, tant du point de vue de la réponse d'urgence à l'acidité, que pour sa capacité à établir une colonisation durable de sa niche. Si les mécanismes enzymatiques requérant le nickel sont bien connus, on sait peu de choses sur la manière dont le trafic de ce métal est organisé dans la cellule. L'étude de

Seshadri et al. a permis de dégager des rôles possibles de Hpn et Hpn-2 dans le métabolisme du nickel et la physiologie cellulaire dépendante du nickel (*Seshadri et al.*, 2007). Cependant, cette étude présente des biais méthodologiques et des observations discutables que nous critiquerons dans la partie expérimentale de cette thèse.

Le travail réalisé au cours de cette thèse a pour but d'étudier *in vivo* le rôle des protéines Hpn et Hpn-2 et leur implication sur le fonctionnement des enzymes à nickel, la sensibilité aux métaux et la gestion du stock de nickel intracellulaire. De plus, afin de déterminer la place de Hpn et Hpn-2 au sein du réseau d'effecteurs permettant l'homéostasie du nickel, nous avons recherché les partenaires d'interaction de ces protéines.

4. Régulation transcriptionnelle des protéines reliées au nickel

Le maintien à l'équilibre de la concentration intracellulaire en nickel implique que *H. pylori* puisse moduler l'importation et le stockage de ce métal en fonction des conditions environnementales. *H. pylori* possède un régulateur transcriptionnel répondant au nickel, NikR. Cette protéine agit de manière pléiotropique et régule globalement la physiologie cellulaire.

4.1. Généralités sur NikR

NikR est un régulateur transcriptionnel responsable de la réponse globale de *H. pylori* au nickel (Contreras *et al.*, 2003). Largement distribué chez les bactéries, c'est le seul métallorégulateur de la famille *Ribbon-Helix-Helix* (Chivers & Sauer, 1999; Rodionov *et al.*, 2006).

Initialement identifié chez *E. coli*, NikR lie le nickel et, en réponse, se fixe au site opérateur palindromique de l'opéron *nikABCDE* (GTATGA-N₁₆-TCATAC) codant pour le transporteur membranaire du nickel, entraînant un arrêt de sa transcription par défaut de recrutement de l'ARN-polymérase (Pina *et al.*, 1999). De manière surprenante, NikR ne semble posséder aucune autre cible chez *E. coli*.

La structure de NikR chez *E. coli* (*Ec*-NikR) révèle un tétramère où chaque monomère comporte un domaine C_{ter} qui fixe le nickel et un domaine N_{ter} qui contient le motif *Ribbon-Helix-Helix*. C'est par ce domaine que la protéine lie l'ADN (Figure 31) (Schreiter *et al.*, 2003).

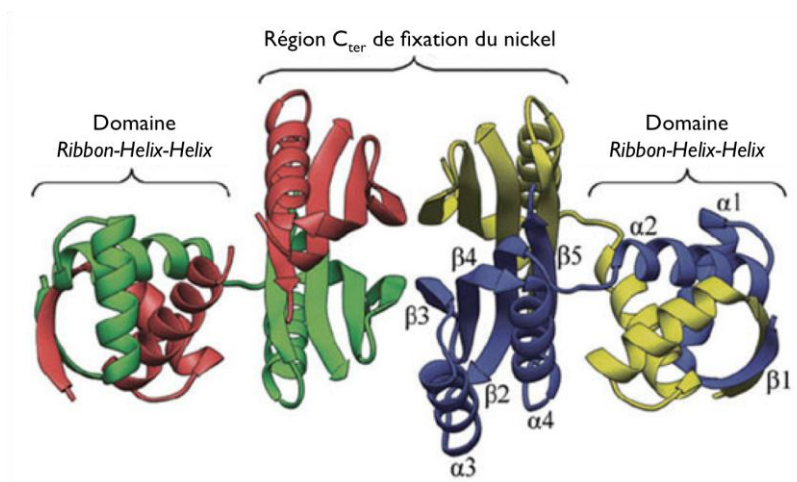


Figure 31 Structure cristalline de NikR de *E. coli*

Diagramme de NikR de *E. coli* sous forme apo. A droite en noir sont indiqués les hélices α et feuillets β caractéristiques du monomère de NikR. Chaque monomère constituant le tétramère actif est indiqué dans une couleur différente. Figure adaptée de (Schreiter *et al*, 2003).

Ec-NikR possède deux types de sites de liaison au nickel situés à l'interface du tétramère : des sites de haute affinité ($K_d \approx 7$ pM) et des sites de faible affinité ($K_d \approx 10$ μ M). Le nickel est coordonné à ces sites *via* trois histidines et une cystéine (Schreiter *et al*, 2003). Cette caractéristique semble être commune aux différentes protéines NikR et a été retrouvée dans les structures cristallines des NikR de *Pyrococcus horokoshii* et de *H. pylori* (Dian *et al*, 2006). Cependant, il est proposé que ces sites jouent un rôle différent dans la stabilisation du complexe NikR/ADN.

Les structures montrent que le tétramère NikR sous forme apo adopte une configuration ouverte défavorable à l'établissement d'une liaison avec l'ADN. La liaison du nickel aux sites de faible affinité engendre un changement conformationnel qui permet à la molécule d'accéder à un premier niveau d'activation autorisant la reconnaissance des sites de régulation sur l'ADN. La liaison du nickel aux sites de faible affinité, autrement dit, quand la concentration en nickel dans la cellule devient plus importante, augmente de plus de 250 fois l'affinité de NikR pour les opérateurs reconnus. NikR se stabilise sur l'ADN et établit des interactions avec les deux moitiés de la séquence opérateur (Figure 32). Il est prédit que la protéine atteigne *in vivo* des niveaux d'efficacité différents en fonction de la concentration intracellulaire en nickel, nulle, faible, ou élevée (Chivers & Tahirov, 2005; Dian *et al*, 2006).

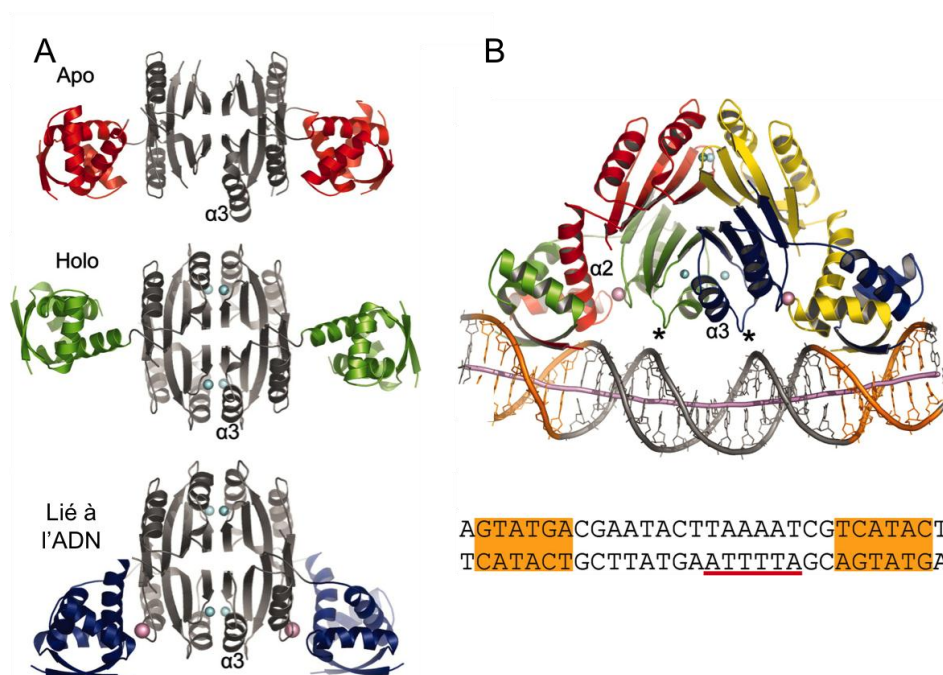


Figure 32 Structure dynamique de NikR chez *E. coli*

A : Flexibilité de la protéine NikR en fonction de sa liaison au nickel ou à l'ADN. B : Complexe de NikR avec l'ADN. La séquence prototype représentée en bas de la figure est constituée de l'opérateur de l'opéron *nikABCDE* de *E. coli*. Les bases surlignées en orange constituent le point de contact de NikR sur l'opérateur. Les bases soulignées en rouge correspondent à la région -10 du promoteur. Les ions nickel sont représentés par les sphères vertes. Les sphères roses représentent les ions potassium K^+ . Ces ions potassium proviennent du tampon utilisé pour la cristallisation et il est probable que *in vivo*, lorsque la concentration en nickel augmente, celui-ci prenne la place du potassium. Figure adaptée de (Schreiter *et al*, 2006).

La protéine NikR de *H. pylori* possède 21% d'identité de séquence avec *Ec*-NikR. Chez *H. pylori*, les caractéristiques globales de *Ec*-NikR sont conservées. Toutefois, si les résidus composant les sites de liaison de faible affinité sont conservés, les structures cristallines n'ont pas permis à ce jour d'identifier du nickel fixé à ces sites. De plus, les mutations de ces sites n'entraînent pas une diminution de l'affinité de NikR pour l'ADN. Le rôle de ces sites chez *H. pylori* n'est donc pas clairement établi (West *et al*, 2010, 2012). L'originalité structurale du NikR de *H. pylori* réside dans la présence de sites de liaison au nickel additionnels à ceux identifiés dans les autres espèces. Le premier site de liaison, appelé site externe, est localisé à la surface de l'interface de tétramérisation. L'autre site, appelé site intermédiaire de liaison, servirait de zone de fixation temporaire pour le nickel, en transit soit pour le site externe, soit pour le site de haute affinité (Figure 33).

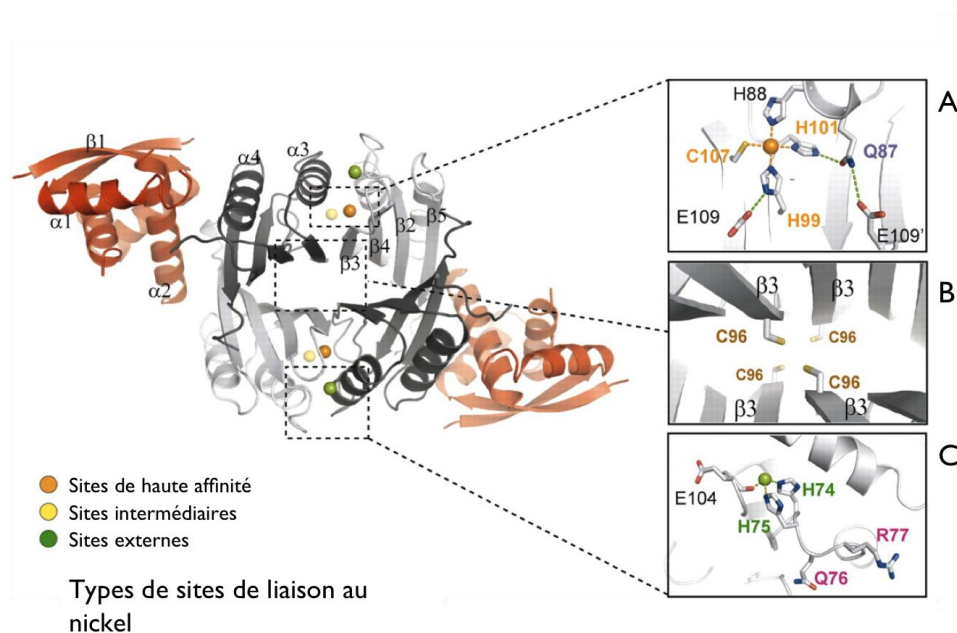


Figure 33 Localisation des sites de liaison du nickel sur le tétramère NikR de *H. pylori*

Diagramme de la structure de NikR chez *H. pylori*. Le domaine de liaison à l'ADN est indiqué en rouge ou saumon et le domaine de tétramérisation en gris ou noir. Le nickel est représenté par les sphères oranges, jaunes ou vertes. L'environnement de coordination du nickel dans chaque site est explicité par les agrandissements à droite : A, sites de haute affinité et sites intermédiaires ; C, sites externes. B : résidus situés à l'interface de tétramérisation. Figure adaptée de (Bahlawane *et al*, 2010).

Chez *H. pylori*, des données obtenues en diffusion des rayons X aux petits angles (*Small-angle X-ray scattering*, SAXS) suggèrent que le tétramère de NikR est déjà dans une configuration favorable et que la liaison du nickel n'entraîne pas de changement conformationnel majeur. Alors que les sites de liaison au nickel de haute affinité sont absolument requis pour lier l'ADN, ils ne sont cependant pas suffisants. Le rôle des sites externes est alors primordial. Ils ne pourront être chargés qu'après coordination du nickel sur les sites de haute affinité. Leur chargement provoque un léger changement de conformation de la protéine qui augmente l'avidité de NikR pour les promoteurs de faible affinité. On peut aussi noter que la liaison aux promoteurs *in vitro* peut nécessiter du manganèse. Cette observation permet de spéculer sur le rôle d'autres métaux nécessaires à une liaison efficace de NikR à l'ADN (Zambelli *et al*, 2008; Bahlawane *et al*, 2010; West *et al*, 2012).

4.2. Régulation fonctionnelle due à NikR

Chez *E. coli* NikR a pour seul effet d'inhiber la transcription de l'opéron *nikABCDE* et par conséquent limite l'entrée du nickel dans la cellule. Le génome de *H. pylori* ne code que pour 17 protéines identifiées comme facteurs de transcription ou régulateurs. Cette caractéristique se traduit par une importante interconnexion des circuits régulateurs (Danielli *et al*, 2010). NikR a

de nombreuses cibles chez *H. pylori* et agit selon le promoteur cible comme activateur ou répresseur de la transcription. Selon que le site de fixation de NikR sur le chromosome sera proximal ou distal du promoteur régulé, NikR aura des effets différents. En position proximale, au niveau de la région -10 du promoteur, NikR aura un effet inhibiteur de la transcription, alors qu'en amont du promoteur il aura un effet activateur (Danielli & Scarlato, 2010). On ne connaît pas la séquence consensus du site de fixation de NikR chez *H. pylori*, ni le mécanisme selon lequel NikR exerce soit un effet activateur, soit un effet répresseur selon la cible.

La régulation par NikR cible des gènes impliqués dans le métabolisme du nickel, mais aussi le chimiotactisme, la mobilité, la respiration, le métabolisme du fer et du cuivre, et les protéines de membrane externe. La délétion de *nikR* chez *H. pylori* conduit à une susceptibilité accrue aux métaux et à une diminution de la capacité de colonisation du modèle murin (Contreras *et al*, 2003; Bury-Moné *et al*, 2004).

Ainsi, concernant la régulation du métabolisme du nickel, il a été montré que NikR liait directement les promoteurs des gènes *ureAB*, *hpn*, *hpn-2*, *hspA* qu'il active. La liaison aux promoteurs des gènes *nixA*, *exbBD-tonB*, *FrpB4*, *hydABC*, *fecA3*, *fur* et *nikR* lui-même, conduit en revanche à une répression de l'expression de ces gènes (Muller *et al*, 2011).

Une étude menée dans notre laboratoire a montré que la réponse de NikR au nickel est dose-dépendante ; à faible concentration en nickel, les gènes cibles activés par NikR sont transcrits alors qu'une concentration plus importante est nécessaire pour réprimer les autres cibles de NikR (Muller *et al*, 2011). Cette observation est peut-être à mettre en perspective avec des changements structuraux ou d'affinité de NikR suite à l'occupation de sites de coordination secondaires, comme discuté au point précédent.

Ainsi se dessine un schéma de réponse où les protéines impliquées dans le stockage du nickel (y compris l'uréase) vont être activées à faible concentration alors que la répression du transport se fera à une concentration plus élevée (Muller *et al*, 2011). Cette observation est cohérente avec le grand nombre de protéines de liaison au nickel chez *H. pylori*. Ces protéines confèrent à *H. pylori* la capacité à séquestrer et à stocker le nickel quand il est disponible plutôt que d'immédiatement réprimer son importation.

4.3. Cinétique de la réponse par NikR

Dans le paragraphe précédent, nous avons abordé la régulation des cibles de NikR en fonction de la concentration en nickel. Cependant, Muller *et al*. dans notre laboratoire ont découvert un autre niveau de régulation exercé par NikR. Lors d'une exposition au nickel, l'activation de la transcription de l'uréase est effective trente minutes seulement après

l'exposition au nickel alors que l'induction de *hpn* et *hpn-2* nécessite au moins une heure. La répression du transport est en revanche très retardée et nécessite jusqu'à 5 heures (Muller *et al*, 2011). Ce résultat est cohérent avec les observations relatives à la régulation dépendante de la concentration en nickel puisque le mécanisme de répression des gènes cibles nécessite une concentration en nickel supérieure au mécanisme d'activation. Il y a donc nécessité d'importer le nickel de façon prolongée pour que la concentration cytoplasmique en nickel atteigne un niveau rendant possible la répression du transport.

L'activité de NikR sur chaque gène du métabolisme du nickel, ainsi que la régulation temporelle de ces gènes, conduit à une réponse au nickel hiérarchisée et complexe, d'autant plus que n'ont pas été abordés ici les effets directs et indirects de NikR sur le métabolisme du fer ou la virulence (Figure 34).

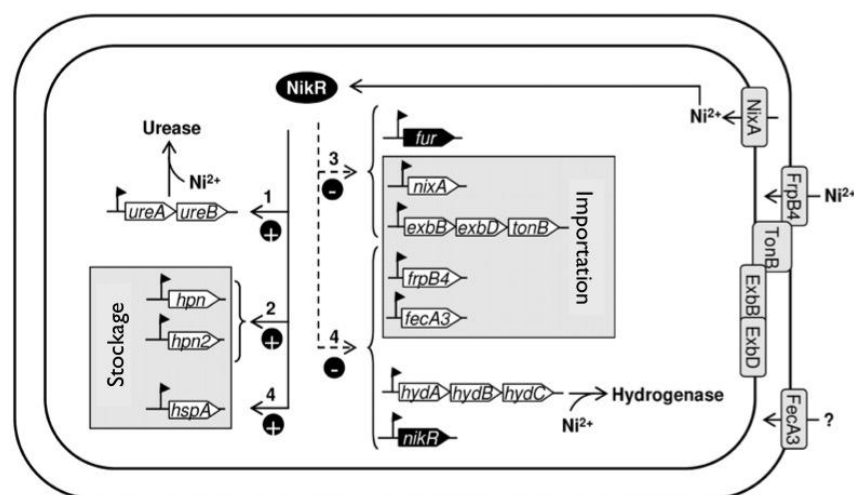


Figure 34 Schéma récapitulatif de la régulation hiérarchisée des cibles de NikR chez *H. pylori*

Les gènes cibles activés par NikR sont indiqués par les flèches en trait plein alors que ceux réprimés sont indiqués en pointillés. Les numéros indiquent la hiérarchie temporelle de réponse : 1, réponse rapide ; 4, réponse retardée. Figure adaptée de (Muller *et al*, 2011).

4.4. Interconnexion des circuits régulateurs

Les gènes *fur*, *tonB-exbBD* et *fecA3*, prédit comme un transporteur de nickel, impliqués dans le métabolisme du fer et du nickel, sont réprimés par NikR en présence de nickel. Chez *H. pylori* Fur joue un rôle important en régulant plus de 200 gènes impliqués dans le métabolisme des métaux, la virulence et la réponse à l'acidité. Fur se fixe au fer et holo-Fur lie les promoteurs des gènes cibles et réprime leur transcription (Delany *et al*, 2005). Cependant, de manière originale, chez *H. pylori*, apo-Fur peut également lier et activer certains promoteurs comme ceux des gènes de la ferritine et de la superoxyde dismutase. Fur a donc des effets différents selon qu'il est sous forme apo ou holo. La régulation croisée de Fur et de NikR conduit à une grande complexité de la réponse aux métaux chez *H. pylori*.

On peut aussi noter que *in vitro* l'affinité de NikR pour le promoteur de l'uréase est fonction du pH et de la concentration en nickel. Ainsi, à pH neutre, la liaison de NikR au promoteur de *ureAB* est dépendante du nickel alors qu'elle est indépendante à pH acide (Li & Zamble, 2009a). La concentration en nickel va donc directement influencer la réponse à l'acidité et *vice versa*.

L'interconnexion des circuits de réponse à l'acidité, au nickel et au fer est extrêmement complexe. Il faut souligner l'intégration de la virulence au sein des mêmes circuits régulateurs chez *H. pylori*. La bactérie s'accommode donc d'un nombre réduit de régulateurs transcriptionnels par une réponse intégrée aux conditions environnementales. Pour une revue, voir (Danielli & Scarlato, 2010).

Contexte et questions posées

Pour coloniser sa niche de façon durable, *H. pylori* a mis en place une réponse d'urgence à l'acidité reposant sur l'activité de l'uréase, métalloenzyme à nickel abondante. Le nickel étant indispensable au bon fonctionnement de l'uréase, métabolismes du nickel et de l'ammoniac sont indissociables. Le nickel est un composé indispensable à *H. pylori* mais son accumulation dans le cytoplasme pourrait s'avérer toxique. Le métabolisme du nickel doit donc être finement régulé pour fournir une quantité de métal suffisante à l'adaptation de *H. pylori* dans sa niche. Cependant, des mécanismes doivent être mis en place afin de se prémunir contre les effets délétères de ce métal à haute concentration dans le cytoplasme.

H. pylori possède deux petites protéines, Hpn et Hpn-2, qui se caractérisent par leur richesse en histidine et leur capacité à fixer le nickel *in vitro*. Nous avons exploré chez *H. pylori* la résistance aux concentrations excessives en métaux conférée par ces protéines ainsi que leur capacité à former des réservoirs intracellulaires de nickel. Parce que ces protéines influencent la concentration intracellulaire en nickel il est intéressant d'évaluer leur influence sur l'activité de l'uréase. Dès lors que l'activité uréasique est altérée, il paraît indispensable de tester les mutants des protéines Hpn et Hpn-2 dans le modèle murin de colonisation.

La production d'ammoniac par *H. pylori* n'est pas limitée à la réponse d'urgence à l'acidité. Il a été rapporté qu'une production d'ammoniac avait lieu en présence de glutamine et d'asparagine chez *H. pylori*. Nous avons caractérisé les activités enzymatiques responsables de la production d'ammoniac à partir de la glutamine et de l'asparagine chez *H. pylori*. Nous nous sommes ensuite intéressés au devenir de l'aspartate et du glutamate produits. La régulation de ces systèmes couplés d'hydrolyse et de transport a ensuite été explorée, ainsi que leur essentialité dans la colonisation du modèle animal.

L'ammoniac est un composé fortement produit par *H. pylori*. Cependant, labile et potentiellement toxique, nous avons postulé que sa synthèse et son utilisation devaient être optimisées et contrôlées. L'étude en TAP de l'uréase de *H. pylori* menée par Stingl *et al.* a permis de mettre en évidence une interaction entre la glutamine synthétase et l'uréase (Stingl *et al.*, 2008). Nous avons cherché à identifier les complexes protéiques au sein du métabolisme de l'ammoniac. Une étude systématique cherchant à identifier les interactions entre les différents acteurs du métabolisme de l'ammoniac a été réalisée par BACTH.

Données expérimentales

Chapitre I. Hpn et Hpn-2, effecteurs centraux de la régulation de l'activité uréasique et nouveaux facteurs de virulence

I. Eléments de contexte et problématique

H. pylori dépend fortement du nickel pour survivre dans sa niche écologique. Le nickel est le cofacteur métallique de deux enzymes essentielles à la colonisation : l'uréase, qui permet la résistance à l'acidité gastrique, et l'hydrogénase, enzyme apportant à *H. pylori* une voie respiratoire alternative lui permettant d'utiliser l'hydrogène moléculaire comme source d'énergie.

L'uréase représente de 6 à 10 % des protéines totales et nécessite 24 ions nickel par complexe actif. Par conséquent, les besoins en nickel de *H. pylori* sont très élevés. La concentration en nickel est globalement extrêmement faible chez l'homme, variant entre 2 et 11 nM dans le plasma. Pour couvrir ses besoins en nickel, *H. pylori* a par conséquent mis en place des stratégies d'acquisition élaborées et efficaces.

La concentration intracellulaire en nickel chez *H. pylori* est 50 fois supérieure à celle rencontrée chez *E. coli* (Schauer, 2007). Comme pour les autres cofacteurs métalliques, cette bactérie possède des mécanismes de stockage, d'import et d'export du nickel dont les activités

doivent être contrôlées de manière coordonnée afin d'empêcher les effets cellulaires délétères des métaux à haute dose.

H. pylori possède un nombre important de protéines riches en histidine. Parmi celles-ci, nous nous sommes intéressés aux protéines Hpn et Hpn-2. Ces deux petites protéines, respectivement de 7 et 9 kDa, ont initialement été identifiées par leur capacité à lier le nickel *in vitro*. Ces deux protéines se caractérisent par des répétitions de résidus histidine à hauteur de 47% de la séquence totale pour Hpn et de 25% pour Hpn-2. De plus, Hpn-2 possède un domaine C_{ter} composé de 41% de résidus glutamine. Des études *in vitro* réalisées par d'autres groupes ont démontré la capacité de ces protéines à se multimériser et à fixer les métaux : nickel, zinc, cuivre et bismuth (Ge *et al*, 2006; Zeng *et al*, 2008; Witkowska *et al*, 2011, 2012a). De par ces propriétés, l'hypothèse d'un rôle de Hpn dans le stockage et la détoxification du nickel intracellulaire a été investigué. Une toute première étude avait conclu à l'absence de rôle de Hpn dans l'activité uréasique (Gilbert *et al*, 1995).

Une seconde étude menée *in vivo* chez *H. pylori* a examiné le rôle des protéines Hpn et Hpn-2 dans la physiologie cellulaire (Seshadri *et al*, 2007). Les auteurs ont montré que des mutants de *hpn* et *hpn-2* étaient plus sensibles au nickel et présentaient une activité uréasique supérieure à celle de la souche sauvage, le mutant de *hpn-2* présentant le phénotype le plus marqué. Curieusement, le double mutant *hpn hpn-2* présentait des phénotypes incohérents avec ceux des simples mutants.

Après analyse de la stratégie expérimentale de Seshadri *et al*, nous avons constaté que cette équipe n'avait pas construit des délétions totales des différents gènes, mais simplement des interruptions, conduisant à l'expression de protéines tronquées correspondant à environ la moitié des protéines de la souche sauvage (Seshadri *et al*, 2007).

Dans le fond génétique de la souche B128 (Farnbacher *et al*, 2010) de *H. pylori*, nous avons donc construit les mutants simples, ou doubles, de *hpn* et *hpn-2* par délétion totale des gènes et remplacement de ceux-ci par une cassette non polaire de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine, respectivement. Parallèlement, nous avons complémenté ces mutants par expression du gène correspondant, en *trans*, sur un plasmide inducible à l'IPTG. Nous avons alors évalué la sensibilité de la souche sauvage B128 et des mutants isogéniques aux excès de nickel, de cobalt et de bismuth. Ensuite, en collaboration avec Pierre Richaud au CEA de Cadarache, le contenu intracellulaire en nickel a été mesuré avec ou sans supplémentation en nickel dans le milieu de culture. Nous avons aussi mesuré l'activité de l'uréase dans les différentes souches, selon les mêmes modalités de supplémentation du milieu

de culture en nickel. Enfin, les simples et doubles mutants ont été testés dans le modèle murin de colonisation. De plus, pour investiguer le rôle de la région C_{ter} riche en glutamine de Hpn-2, un mutant déficient pour cette région a été construit et son phénotype évalué selon les mêmes critères que les mutants totaux.

Les protéines Hpn et Hpn-2 présentant des séquences originales, aussi avons-nous décidé de mener une analyse phylogénétique de ces protéines en collaboration avec Céline Brochier-Armanet au Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive de l'Université de Lyon-I. Pour finir, il nous a paru important d'identifier les partenaires protéiques de Hpn et Hpn-2. En collaboration avec Daniel Vinella, dans notre laboratoire, nous avons donc testé par BACTH les interactions de Hpn et Hpn-2 avec les protéines dont l'implication dans le métabolisme du nickel est connue. L'ensemble de ces résultats est compilé dans le manuscrit d'un article en préparation.

2. Résumé des résultats

2.1. Distribution de Hpn et Hpn-2 dans le genre *Helicobacter*

A partir des génomes complets disponibles de 38 isolats de *H. pylori* et de 12 génomes issus de 10 espèces de *Helicobacter* non *pylori* (Tableau 3), la distribution des gènes codant pour les protéines Hpn et Hpn-2 a été recherchée.

Espèce	Souche	Tropisme	Hôte naturel
<i>Helicobacter pylori</i>	2017	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	2018	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	26695	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	35A	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	51	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	52	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	83	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	908	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	B38	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	B8	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Cuz20	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	ELS37	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	F16	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	F30	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	F32	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	F57	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	G27	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Gambia 94 24	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	HPAGI	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	HUP-B14	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	India7	Gastrique	Homme

Espèce	Souche	Tropisme	Hôte naturel
<i>Helicobacter pylori</i>	J99	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Lithuania75	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	P12	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	PeCan4	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	PeCan18	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Puno120	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Puno135	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Sat464	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Shi112	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Shi169	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Shi417	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Shi470	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	SJM180	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	Snt49	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	SNT49	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	SouthAfrica7	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter pylori</i>	v225d	Gastrique	Homme
<i>Helicobacter acinonychis</i>	Sheeba	Gastrique	Fauves
<i>Helicobacter bizzozeronii</i>	CIII-I	Gastrique	Chien, chat, homme
<i>Helicobacter canadensis</i>	MIT 98-5491	Entérohépatique	Homme
<i>Helicobacter cinaedi</i>	PAGU611	Entérohépatique	Homme
<i>Helicobacter cinaedi</i>	CCUG 18818	Entérohépatique	Homme
<i>Helicobacter cetorum</i>	MIT 00-7128	Gastrique	Dauphin, baleine
<i>Helicobacter cetorum</i>	MIT 99-5656	Gastrique	Dauphin, baleine
<i>Helicobacter felis</i>	ATCC 49179	Gastrique	Chat
<i>Helicobacter hepaticus</i>	ATCC 51449	Entérohépatique	Homme
<i>Helicobacter mustelae</i>	12198	Gastrique	Furet
<i>Helicobacter pullorum</i>	MIT 98-5489	Entérohépatique	Homme
<i>Helicobacter winthamensis</i>	ATCC BAA-430	Entérohépatique	Homme

Tableau 3 Souches de *Helicobacter* testées pour établir la phylogénie de Hpn et Hpn-2

L'analyse globale des génomes disponibles par tBlastN, puis l'analyse ciblée par BlastN dans les génomes donnant des résultats ambigus montre que *hpn* est conservé en une seule copie dans tous les isolats de *H. pylori* et ses deux plus proches parents, *H. acinonychis*, pathogène des grands félins, et *H. cetorum*, pathogène des cétacés. Pour ces deux dernières espèces, le gène *hpn* n'avait pas été annoté dans le génome. Ces deux espèces sont uréase positives et possèdent un tropisme gastrique. Cependant, il existe d'autres espèces uréase positives à tropisme gastrique, comme *H. mustelae* ou *H. felis*, qui ne possèdent pas *hpn*. Il n'y a donc pas de corrélation directe entre tropisme gastrique, présence d'une uréase, et présence de *hpn*.

De manière très intéressante, la distribution de *hpn-2* est strictement limitée à *H. pylori*. Pour finir, les gènes *hpn* et *hpn-2* ne sont présents qu'en une seule copie dans les génomes de *H. pylori* et leur séquence nucléotidique est extrêmement conservée entre souches de *H. pylori*.

2.2. Analyse de la conservation de Hpn et Hpn-2

L'analyse de la séquence protéique de Hpn montre un segment répété en N_{ter} (Figure 35).

MAHHEEQHGGHHHHHTHHHYHGGHHHHHSSHHHEEGCCSTSDSHHQEEGCCGHHE

Figure 35 Région répétée de Hpn

Jaune, séquence de référence ; vert, séquence répétée. Séquence protéique issue de la souche 26695 de *H. pylori*.

L'alignement des séquences de Hpn tant protéiques que nucléotidiques montre une conservation exceptionnelle pour *H. pylori* dont le génome est très variable. On observe juste un *indel* d'un acide aminé dans quelques souches (Figure 36).



Figure 36 Alignement des séquences protéiques de Hpn

La séquence protéique de Hpn-2 est plus variable et le nombre d'*indels* est plus important. Ils sont localisés en N_{ter} et en C_{ter} autour d'une région cœur très conservée et très similaire à la séquence répétée de Hpn (Figure 37). Nos résultats montrent que la variabilité concerne majoritairement les résidus glutamine et que peu de variabilité est observée dans les régions riches en histidine.

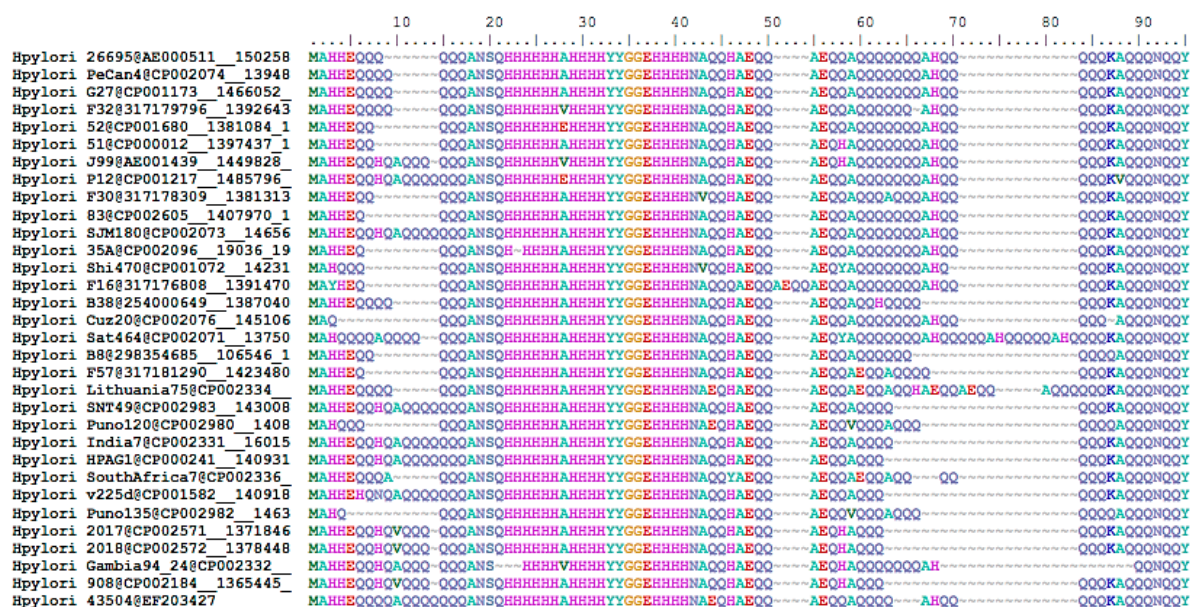


Figure 37 Alignement des séquences protéiques de Hpn-2

La comparaison entre Hpn et Hpn-2 montre une bonne conservation des parties N_{ter} riches en résidus histidine. Par ailleurs, au niveau génétique, le codon utilisé pour coder les histidines est presque toujours CAC. Il y a donc eu une forte pression de sélection pour conserver le nombre ainsi que le code des histidines dans Hpn et Hpn-2. Les répétitions de résidus glutamine dans Hpn-2 sont moins conservées entre génomes. En revanche, on observe là encore une bonne conservation du codon CAA pour coder la glutamine. Plus largement, *hpn* et *hpn-2* sont situés dans région très conservée du génome de *H. pylori* et de *H. acinonychis* et *H. cetorum* pour *hpn*. Une telle conservation est très inattendue chez *H. pylori*. Cette région est inversée chez *H. acinonychis* et *H. cetorum* par rapport à *H. pylori* indiquant qu'une inversion a eu lieu durant l'évolution menant à l'émergence de *H. pylori*. C'est au moment de cette inversion que pourrait avoir eu lieu la duplication de *hpn* qui a donné lieu à *hpn-2*.

2.3. Essentialité de Hpn et Hpn-2 pour la colonisation

Afin d'examiner l'importance de Hpn et Hpn-2 *in vivo*, nous avons testé les différents mutants pour leur capacité à coloniser le modèle murin d'infection à *H. pylori*. Les résultats ont montré que les simples mutants sont très affectés dans leur capacité à coloniser la souris tandis que le double mutant est totalement déficient pour la colonisation. Nos résultats démontrent donc l'importance fonctionnelle des gènes *hpn* et *hpn-2* *in vivo*.

2.4. Implication de Hpn et Hpn-2 dans la résistance aux concentrations élevées en nickel, cobalt et bismuth

Etant donné la capacité de Hpn et Hpn-2 à fixer les métaux *in vitro*, il était intéressant d'analyser les rôles potentiels de Hpn et Hpn-2 dans la protection contre la toxicité des métaux. Nous avons testé par la méthode de diffusion en disque et mesure du diamètre d'inhibition (comme pour les antibiogrammes) la sensibilité de *H. pylori* au nickel, au cobalt – élément chimique le plus proche du nickel – et au bismuth, composé utilisé en thérapeutique pour traiter l'infection à *H. pylori*.

Nos résultats ont démontré un rôle majeur de Hpn dans la résistance aux excès de nickel, et aucun rôle de Hpn-2. Les résultats sont similaires concernant la résistance aux excès de bismuth. De manière attendue, le mutant *hpn-2ΔC_{ter}* ne présente pas de phénotype. Nous avons reproduit ces résultats dans la souche 26695 de *H. pylori* (Tomb *et al*, 1997).

Concernant le cobalt, nous avons démontré qu'un mutant de *hpn-2* est plus résistant aux excès de cobalt que la souche sauvage, mais que cet effet est dépendant de Hpn. Nous avons donc émis l'hypothèse que Hpn-2 est la cible indirecte de la toxicité du cobalt alors que Hpn serait capable de détoxifier le cobalt en l'absence de Hpn-2.

2.5. Mesures de la concentration intracellulaire en nickel dans les différents mutants

Afin de déterminer le rôle de Hpn et Hpn-2 dans le stockage du nickel et la détoxification, nous avons mesuré la concentration intracellulaire en nickel par la méthode de spectroscopie d'émission optique couplée à un plasma inductif (ICP-OES) en conditions limitantes en nickel, ou avec supplémentation du milieu en nickel.

Nos résultats montrent qu'en conditions limitées en nickel, le mutant de *hpn* se comporte comme la souche sauvage. En conditions d'abondance en nickel, le mutant de *hpn* possède un contenu intracellulaire en nickel près de trois fois inférieur à celui de la souche sauvage, indiquant un rôle de Hpn dans la séquestration du nickel *in vivo*.

En conditions limitantes en nickel, les mutants de *hpn-2*, de *hpn-2ΔC_{ter}* et de *hpn hpn-2* présentent des concentrations intracellulaires en nickel augmentées environ 8 fois par rapport à la souche sauvage. En conditions non limitantes en nickel, le mutant de *hpn-2* et le double mutant *hpn hpn-2* ont un contenu intracellulaire augmenté de deux fois par rapport à la souche sauvage, tandis que le mutant de *hpn-2ΔC_{ter}* se comporte comme la souche sauvage.

Nos résultats démontrent que Hpn-2 est un inhibiteur de l'accumulation du nickel et que son extension C_{ter} riche en glutamine optimise ce rôle en conditions limitantes en nickel.

2.6. Rôle de Hpn et Hpn-2 dans le contrôle de l'activité de l'uréase et de l'hydrogénase

Afin de tester si la concentration intracellulaire en nickel a un effet direct sur l'activité uréasique, nous avons testé l'activité de l'uréase chez les différents mutants, en conditions limitantes ou supplémentées en nickel.

Nos résultats montrent qu'en conditions limitantes en nickel, le mutant de *hpn-2* présente une augmentation d'un facteur 2,5 de son activité uréasique, indépendamment de son extension C_{ter} riche en glutamine.

En conditions non limitantes de nickel, le mutant de *hpn* ainsi que le double mutant *hpn hpn-2* présentent une activité uréasique diminuée par rapport au contrôle. Nos résultats démontrent qu'en conditions non limitantes en nickel, Hpn est nécessaire à l'activation de l'uréase.

Notre hypothèse est alors que Hpn et Hpn-2 prennent part à une chaîne d'activation de l'uréase où Hpn exerce un effet épistatique sur Hpn-2. Hpn-2 entrerait en compétition avec Hpn pour la fixation du nickel. En condition non limitante en nickel, les sites de fixation du métal sur Hpn-2 seraient saturés et Hpn pourrait alors délivrer le nickel à l'uréase.

En collaboration avec Christine Cavazza à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, nous avons mesuré l'activité de l'hydrogénase dans la souche sauvage et les différents mutants de *hpn* et de *hpn-2*. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les mutants et la souche sauvage.

2.7. Impact de Hpn et Hpn-2 sur l'expression de l'uréase

Nous avons ensuite cherché à corréler le niveau d'activité de l'uréase dans les différents mutants avec le niveau d'expression de l'uréase. Nous avons donc quantifié l'uréase par *Western blot* grâce à un anticorps dirigé contre la sous-unité UreA, en conditions limitantes en nickel ou supplémentées, dans les différents mutants.

En conditions limitées en nickel, la quantité d'uréase dans les cellules est identique quel que soit le mutant. En revanche, en condition non limitante en nickel, comme attendu, on observe dans la souche sauvage une augmentation de la quantité de protéine UreA dépendant du temps d'exposition au nickel (Muller *et al*, 2011). Dans les souches mutantes, l'expression de

l'uréase est constitutive et exprimée à un niveau correspondant à celui de la souche sauvage induite par le nickel.

Par conséquent, les phénotypes d'activité uréasique observés dans les souches mutantes ne sont pas imputables à une différence dans la quantité d'enzyme dans la cellule, mais à un défaut de chargement de celle-ci en nickel.

2.8. Interactions de Hpn et Hpn-2 avec les protéines impliquées dans le trafic du nickel

Nous avons émis l'hypothèse que Hpn et Hpn-2 faisaient partie d'une cascade de régulation de l'activité uréasique. Afin d'explorer le trafic du nickel dans la cellule, nous avons souhaité établir le réseau d'interactions entre certaines protéines du métabolisme du nickel de *H. pylori*. Nous avons testé par méthode du BACTH (Karimova *et al*, 1998) les interactions entre Hpn, Hpn-2 et HspA en fusionnant les domaines T18 ou T25 de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* en N_{ter} ou en C_{ter} de ces protéines. Selon les mêmes modalités, l'analyse avec UreE est en cours et n'a démontré d'interaction avec aucun partenaire pour le moment.

Nos résultats ont montré une homomultimérisation de Hpn, en accord avec les résultats des études menées *in vitro*. Par ailleurs, Hpn et Hpn-2 interagissent l'une avec l'autre. Nous avons découvert que les résidus His₃ et His₁₂ de Hpn étaient importants dans l'interaction de Hpn avec Hpn-2. En effet, nous avons généré de manière fortuite un mutant Hpn* de ces deux résidus, respectivement remplacés par une leucine et une arginine. Les protéines Hpn* et Hpn-2 interagissent toujours mais avec une efficacité très atténuée. En revanche, ces résidus n'ont aucune influence sur l'homomultimérisation de Hpn.

Nos résultats montrent aussi une interaction de Hpn avec HspA indiquant un dialogue possible entre la chaperonne à nickel de l'hydrogénase et Hpn, dont le rôle dans le chargement de l'uréase est crucial (données non présentées).

3. Discussion

Une étude *in vivo* de la fonction des protéines Hpn et Hpn-2 de la souche ATCC 43504 de *H. pylori* avait été publiée. Dans cette étude, les gènes *hpn* et *hpn-2* avaient été interrompus par insertion d'une cassette de résistance au centre du gène (Seshadri *et al*, 2007). Nous avons caractérisé le rôle de ces deux protéines dans la souche B128 et dans la souche 26695 à l'aide de mutants de délétion totale des gènes *hpn* et *hpn-2*. Plusieurs de nos résultats sont en contradiction avec ceux de Seshadri *et al*. et ce malgré des séquences de *hpn* et *hpn-2* proches. Nous ne confirmons pas leur phénotype d'un mutant de *hpn-2* qui devient hypersensible au

nickel, bien que nous ayons comme Seshadri et *al.* construit une version tronquée de la protéine Hpn-2 délétée de sa partie C_{ter}.

Nous avons démontré que Hpn joue un rôle majeur dans la détoxification du cytoplasme vis-à-vis des concentrations excessives en nickel, bismuth et cobalt. Bien que Hpn puisse fixer le zinc et le cuivre *in vitro*, aucune différence de sensibilité à ces métaux n'a été constatée dans nos expériences. Les effets protecteurs de Hpn sont indépendants de Hpn-2, démontrant un rôle de Hpn dans la séquestration des métaux en excès. De plus, le fait que Hpn puisse détoxifier le bismuth indique que la protéine est capable de fixer également des cations trivalents, probablement par les couples de cystéines 42-43 et 55-56 comme le suggèrent les expériences *in vitro* (Rowinska-Zyrek *et al.*, 2011).

Nous avons découvert que Hpn-2 exerce un effet délétère en présence de concentrations excessives de cobalt. Cet effet est dépendant de Hpn. Il a été montré que le cobalt exerce chez *E. coli* ses effets toxiques par destruction des centres [Fe-S] (Fantino *et al.*, 2010). Notre modèle de travail implique un transfert de nickel de Hpn-2 vers Hpn, puis de Hpn vers l'uréase. Le phénotype du mutant Hpn-2 vis-à-vis du cobalt, mis en perspective avec les données de toxicité chez *E. coli*, suggère que Hpn-2 serait capable de délivrer les ions métalliques qu'il a fixés à d'autres protéines. Une autre explication serait qu'en présence de Hpn-2 le cobalt serait moins bien séquestré par Hpn et exercerait donc une toxicité accrue.

De manière intéressante, nous avons révélé que les mutants de Hpn-2 possèdent un contenu intracellulaire en nickel augmenté par rapport à la souche sauvage. Cependant, on n'observe pas chez ces souches une corrélation directe entre concentration intracellulaire et toxicité du nickel. Premièrement nos résultats indiquent que Hpn-2 restreint l'intoxication des cellules au nickel. Deux hypothèses sont envisagées. Soit Hpn-2 peut bloquer l'entrée de ce métal, soit il peut en augmenter l'exportation. Deuxièmement, nos données prouvent qu'en présence de Hpn, il faut que le *pooI* de Hpn soit saturé en nickel pour que celui-ci soit toxique. Ainsi, nous apportons la preuve que ce n'est pas le nickel par lui-même qui est toxique, mais le fait qu'il soit sous une forme non séquestrée par Hpn.

Nous avons montré que Hpn-2 est un régulateur négatif de l'activité uréasique en conditions limitantes de nickel tandis que Hpn est un activateur de l'uréase en conditions non-limitantes, indépendamment de Hpn-2. Notre interprétation est la suivante : de par la plus forte affinité de Hpn-2 pour le nickel, ce métal se lierait en premier sur Hpn-2 jusqu'à saturation de la protéine. Ensuite, le nickel pourrait se fixer sur Hpn, qui pourrait en faciliter le chargement au

sein de l'uréase. Ce mécanisme de chargement séquentiel expliquerait l'effet épistatique de Hpn sur Hpn-2 (Figure 38).

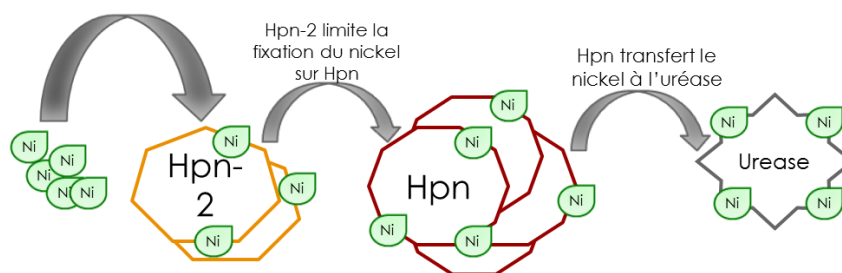


Figure 38 Modèle présentant un mécanisme d'activation séquentiel de l'uréase dépendant de Hpn et Hpn-2

Une telle cascade d'activation est confortée par les données de BACTH qui montrent une interaction entre les protéines Hpn et Hpn-2. Notre étude interactomique a aussi démontré une interaction entre Hpn et HspA indiquant un dialogue entre HspA, dont le rôle est prépondérant dans l'activation de l'hydrogénase à [NiFe], et Hpn, dont nous avons prouvé l'importance pour l'activation de l'uréase. Nous avons déjà évoqué le recouvrement des voies de maturation de l'uréase et de l'hydrogénase au niveau des protéines accessoires de maturation de ces deux enzymes dans l'introduction de cette thèse. Il semble que cette interconnexion soit également retrouvée au niveau des chaperonnes. Il faut cependant noter que Hpn n'a aucune influence sur l'activité de l'hydrogénase tandis que HspA ne participe pas à l'activation de l'uréase.

Nous avons constaté une augmentation de la quantité de nickel intracellulaire dans le mutant Hpn-2, on peut supposer que Hpn-2 est directement impliqué dans un blocage de l'import ou l'export du nickel.

Les données du contenu intracellulaire en nickel indiquent clairement que Hpn constitue un réservoir de nickel *in vivo*. *H. pylori* possède une concentration intracellulaire en nickel 50 fois supérieure à celle de *E. coli* (Schauer, 2007). On aurait pu penser que cela était dû au *pool* d'uréase ; en conditions normales, nous avons des indications que seule une fraction du *pool* cellulaire d'uréase est chargée en nickel (Stingl & De Reuse, 2005). Seuls *H. acinonychis*, *H. cetorum*, et *H. pylori* ont conservé la protéine Hpn. De plus, nos analyses contredisent le premier article décrivant Hpn chez *H. mustelae* alors que le génome de cette souche ne possède pas le gène correspondant (Gilbert *et al*, 1995). Nous pouvons donc conclure qu'il n'y a pas de corrélation directe entre présence de Hpn et tropisme gastrique ou présence d'une uréase. Hpn-2 est strictement restreinte à *H. pylori*. Notre analyse suggère que *hpn* a émergé

chez l'ancêtre commun à *H. pylori*, *H. acinonychis* et *H. cetorum*. Une hypothèse plausible est que *H. acinonychis* est né dans un félin qui se serait contaminé par *H. pylori* ou son ancêtre en mangeant un homme (Eppinger *et al*, 2006).

Nous avons montré que Hpn et Hpn-2 sont essentielles à la colonisation du modèle animal. Hpn-2 est spécifique à *H. pylori* tandis que Hpn est aussi présent dans les deux espèces les plus proches phylogénétiquement, *H. acinonychis* et *H. cetorum*. Nous pouvons donc supposer que Hpn et Hpn-2 apportent à *H. pylori* un avantage adaptatif pour la colonisation de l'hôte humain. *Helicobacter bilis* et *H. hepaticus* sont associés à la survenue accrue de cancers hépatobiliaires chez les porteurs (Nath, 2010). Parmi les *Helicobacter*, *H. pylori* et *H. mustelae* sont les seules espèce capables de causer des cancers gastriques dans leur hôte respectif, l'homme et le furet (O'Toole *et al*, 2010). Nous pouvons donc supposer un rôle important de ces protéines dans la virulence, de même que dans la pathogenèse. En effet, *H. pylori* est une de deux espèces à pouvoir causer des cancers gastriques. On pourrait donc imputer un rôle de Hpn et Hpn-2 dans la cancérogenèse.

Concernant l'évolution des gènes Hpn et Hpn-2 la caractéristique la plus remarquable de Hpn et Hpn-2 est la conservation quasi parfaite de la région N_{ter} riche en histidines de ces protéines. Cette conservation en acides aminés est d'autant plus remarquable qu'elle s'accompagne d'une conservation en codons. De plus, si la fonction de Hpn était seulement de fixer du nickel, on pourrait observer une expansion des résidus histidine. La pression de sélection s'exerce donc aussi pour conserver le nombre de résidus histidine.

Il est très probable que le gène *hpn-2* ait été acquis par duplication du gène *hpn*, suivie d'une expansion des codons codant pour les résidus glutamine dans la région C_{ter}. Nos résultats montrent que la répression de l'activité uréasique en conditions limitantes en nickel est indépendante de la région riche en glutamine, en revanche, celle-ci est nécessaire pour inhiber l'accumulation du nickel dans la cellule en faibles concentrations de nickel dans le milieu. En accord avec Witkowska *et al*, cette région serait donc impliquée dans la stabilisation du nickel sur Hpn-2 en conditions limitantes (Witkowska *et al*, 2011). Stabilisé sur Hpn-2, le nickel pourrait alors être correctement évacué ou dosé par la bactérie. Des expériences sont en cours au laboratoire pour tenter de mettre en évidence Hpn et Hpn-2 dans des surnageants de culture de *H. pylori* en conditions limitantes ou d'intoxication en nickel. Les expériences préliminaires réalisées n'ont pour l'instant pas permis d'identifier Hpn ou Hpn-2 hors du cytoplasme.

Il a été montré qu'il existait un exportateur de nickel peu spécifique : CznABC (Stähler *et al*, 2006). De toute évidence, ce système échoue à mettre en place une réponse suffisamment efficace pour faire face aux concentrations élevées en nickel. Hpn et Hpn-2 sont alors requises pour fixer le nickel en excès et participer au contrôle de la concentration intracellulaire en nickel.

4. Manuscrit en cours de soumission

Voir pages suivantes.

Evolutionary history and *in vivo* essentiality of two Histidine-rich proteins that control nickel trafficking in *H. pylori*

Julien Gallaud^{1,2}, Daniel Vinella¹, Céline Brochier-Armanet³, Damien Leduc¹, Christine Cavazza⁴,
Pierre Richaud⁵ and Hilde De Reuse^{1*}

¹ Institut Pasteur, Département de Microbiologie, Unité Pathogénèse de *Helicobacter*, ERL CNRS 3526, rue du Dr Roux 75724 PARIS Cedex 15 FRANCE

² Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Cellule Pasteur, rue du Dr Roux 7515 Paris FRANCE

³ Université de Lyon; Université Lyon 1; CNRS; UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne, France

⁴ Groupe Métalloprotéines, Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS UMR 5075 - 38027 Grenoble Cedex 1 FRANCE

⁵ CEA/DSV/IBEB, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries & Microalgues, 13108 Saint Paul Lez Durance, France

* - Corresponding author:

Hilde De Reuse (hdereuse@pasteur.fr)

Institut Pasteur, Unité Pathogénèse de *Helicobacter*

28, rue du Docteur Roux

75724 PARIS Cedex 15 FRANCE

Tel : +33 1 40 61 36 41

Fax : +33 1 40 61 36 40

Abstract

Metal acquisition and intracellular trafficking is crucial for every cell and has been recognized as a virulence determinant in bacterial pathogens. Virulence of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* is dependent on nickel, the co-factor of two enzymes essential *in vivo*, the abundant urease and the [Ni-Fe] hydrogenase. To avoid toxicity, the large amounts of nickel concentrated by *H. pylori* need to be taken in charge by specific nickel-binding protein. We investigated the role of two astonishing *H. pylori* proteins (Hpn and its paralog Hpn-2) proposed to serve as nickel stores because of their content in Histidine (His) residues (Hpn, 45% His and Hpn-2, 26% His and 40% Gln). We observed that Hpn and Hpn-2 are highly conserved in *H. pylori* while Hpn-2 is restricted to this species. Phylogenetic analysis revealed that only two closely related species *Helicobacter acinonychis* and *Helicobacter cetorum* have Hpn-homologues. A model for the evolutionary history of Hpn and Hpn-2 is proposed involving cluster inversion followed by gene duplication. We showed for the first time that Hpn and Hpn-2 are required for colonization of the mouse model. Using assays to measure metal resistance, intracellular nickel concentrations, urease activities together with interactomic analysis, we provide evidence that (i) Hpn is a nickel-sequestration protein that is required for urease activation, (ii) that Hpn-2 is restricting the intracellular nickel accumulation and that its C-terminal Gln-rich region is important for this function, (iii) that Hpn is epistatic on Hpn-2 and, (iv) that Hpn is forming homopolymers *in vivo*, interacts with Hpn-2 and that when two His-residues in Hpn are mutated, this interaction is disrupted. Thus, the combined Hpn/Hpn-2 activities participate in a nickel transfer pathway that controls both nickel accumulation and urease activity in *H. pylori*. In this postulated oriented pathway of nickel transfer, Hpn-2 would act first followed by Hpn and finally urease. Finally, given the absence of nickel enzymes in the human host, the essential Hpn and Hpn-2 proteins are interesting potential therapeutic targets.

Introduction

Helicobacter pylori is a gram-negative bacterium that colonizes the stomach of about half of the human world population. Infection by *H. pylori* causes the development of gastro-duodenal ulcers, MALT lymphoma and gastric carcinoma [1,2]. Gastric cancer is responsible for about 800,000 deaths in the world every year. Virulence of *H. pylori* relies on its capacity to persistently colonize the stomach, a hostile acid niche. The transition metal nickel (Ni^{2+}) is an essential determinant for the virulence of *H. pylori*, because it is the co-factor of urease, an enzyme required for resistance to the gastric acidity and for *in vivo* colonization [3]. Urease catalyzes the hydrolysis of urea into ammonia and bicarbonate, two buffering compounds that allow the bacterium to maintain pH neutrality of its cytoplasm. Urease is very abundant (about 10% of total soluble cellular proteins) and requires up to 24 nickel ions per active enzymatic complex [4]. The [Ni-Fe] hydrogenase is the only other *H. pylori* enzyme that requires nickel for its activity [5]. This enzyme is also important for colonization as it provides *H. pylori* with an alternative respiratory pathway, allowing the use of molecular hydrogen as a substrate [6]. Thus, *H. pylori* needs to acquire large amounts of nickel in order to activate these two essential metallo-enzymes. Accordingly, the nickel intracellular concentration of *H. pylori* cells is about 50 times that of *Escherichia coli* [7]. As for other metal ions, the intracellular nickel concentration of *H. pylori* needs to be strictly controlled at the level of its uptake, storage and efflux. Indeed, non-physiological accumulation of Ni^{2+} generates toxic effects by interfering with other metal-binding proteins thus perturbing essential catalytic reactions that can lead to cell death [8].

The nickel concentration measured in the human body is low (2-11 nM). As expected from the vital need of nickel, *H. pylori* possesses efficient mechanisms to acquire nickel. We previously identified FrpB4, the first TonB-dependent transporter that mediates energized nickel uptake through the outer membrane [9]. Transport across the inner membrane is carried out by the high affinity transporter NixA permease [10]. In *H. pylori*, intracellular nickel trafficking presents several originalities that we aimed to understand better with the present study. First, the pathways of the accessory proteins for nickel incorporation into urease and hydrogenase are overlapping as shown by genetic [11] and interactomic approaches [12]. This suggests the existence of controlled nickel distribution mechanisms between these two enzymes in *H. pylori* [12]. Second, *H. pylori* possesses three atypical histidine-rich proteins, HpsA and the two homologous proteins Hpn and Hpn-2 that we characterized in the present work [13]. We

recently showed that the expression of the *hspA*, *hpn* and *hpn-2* genes are positively regulated by NikR in response to nickel [14]. In addition, poly-histidines motifs are known to strongly bind nickel, therefore a role of these proteins as nickel stores has been proposed. HspA, the sole GroES chaperonine of *H. pylori* displays a C-terminal histidine and cysteine-rich extension that is strictly conserved in this species [15,16]. We recently demonstrated that HspA functions as a nickel sequestration protein and a specialized chaperone for the [Ni-Fe] hydrogenase [15]. In addition, Bismuth (Bi^{3+}) used in combination with antibiotics as an efficient anti-*H. pylori* compound was found to strongly bind to purified HspA protein [17].

The Hpn and Hpn-2 proteins contain an astonishing number of histidine residues mostly clustered into stretches. The Hpn and Hpn-2 proteins of strain B128 [18,19] are represented in Fig. 1. Hpn was the first to be described [20], (ORF HPI427 in strain 26695 [21]). It is a small abundant protein representing about 2% of the total *H. pylori* proteins [20]. Hpn comprises 60 amino acids among which 28 histidine (His) residues and two cysteine (Cys) pairs (MW: 7.08 kDa) (Fig. 1). Hpn-2 also designated Hpn-like or HpnI is 66 amino-acid long in strain B128 (MW: 8.07 kDa) (ORF HPI432 in strain 26695 [21]). Hpn-2 is homologous to Hpn in its N-terminal region and is strongly enriched in glutamine (Gln) repeats in its C-terminal region (Fig. 1). The N-terminal half of Hpn-2 contains 16 His residues (on 34 residues) and its C-terminal region is composed of 21 Gln residues out of 32 amino acids (Fig. 1).

Both proteins have been purified and their *in vitro* metal binding properties characterized. In solution, Hpn exists as an equilibration of multimers predominantly 20-mers [22]. Each monomer binds 5 Ni^{2+} ions with a K_d of 7.1 μM . An Hpn fragment containing the Cys-Cys motifs binds Ni^{2+} , Zn^{2+} and Bi^{3+} , the latter with the highest affinity [23].

Hpn-2 is a 22-mer in its native state, one monomer binds 2 nickel ions with a K_d of 3.8 μM [24]. His29 and His31 were found to be two critical residues for nickel binding [25]. The isolated His-rich N-terminus of Hpn-2 binds Ni^{2+} and Cu^{2+} better than Hpn and it was proposed that the poly-Gln sequence of Hpn-2 stabilizes nickel binding to this protein [26]. For both proteins, *in vitro* nickel binding was found to be reversible at acidic pH or in the presence of EDTA [24,27]. When expressed in *E. coli*, Hpn and Hpn-2 provide protection against nickel toxicity [22,24,25]. Studies of the role of Hpn in *H. pylori* have concluded to its importance for protection against the toxicity of nickel and bismuth [28]. Using mutants in which *hpn* and *hpn-2* were inactivated by a cassette inserted in approximately the middle of the corresponding genes (Fig. 1), Seshadri *et al.* [29] reported that Hpn-2 play a major role in protection against nickel, Hpn a minor role and that both proteins compete with the nickel-dependent urease maturation machinery under low nickel conditions [29]. These results are in contradiction with previous

data reporting wild-type urease activity in a complete *hpn* deletion mutant [20]. Thus, the respective roles of the Hpn/Hpn-2 proteins, their potential interplay in the protection against nickel and other metal's toxicity and in the regulation of nickel trafficking and urease activity remained to be established in *H. pylori*. Therefore, a major purpose of the present work was to determine whether they act as nickel stores to transfer nickel to other proteins, and/or as sequestration proteins for detoxification of nickel and other metals.

Homologues of Hpn were reported to be expressed by *H. mustelae* [20] and *H. felis* [28], nothing was reported for Hpn-2. Given the availability of complete genomes of several non-*pylori Helicobacter* species, we analyzed for the first time the distribution and evolution of Hpn and Hpn-2. We established that Hpn and Hpn-2 are highly conserved in *H. pylori*; that Hpn-2 is restricted to this species and we were able to propose a model for the evolutionary history of these two proteins.

Importantly, we showed for the first time that Hpn and Hpn-2 are required for colonization of the mouse model. Using assays to measure metal resistance, nickel accumulation, urease activity together with interactomic analysis, we provide evidence that combined Hpn/Hpn-2 activities participate in a nickel transfer pathway that controls both nickel accumulation and urease activity in *H. pylori*.

Results

Distribution of *hpn* and *hpn-2* genes among the sequenced *Helicobacter* species

Complete genome sequences of 38 *H. pylori* strains from various geographical origins associated with different pathologies and of 11 non-*pylori* *Helicobacter* species have been made available in the last few years (NCBI database) (Fig. 2A). Among the non-*pylori* *Helicobacter*, 4 are gastric species (*H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. cetorum* and *H. acinonychis*) and the 6 others are enterohepatic. Interestingly, we found genes coding for Hpn and Hpn-2 in every *H. pylori* strain (Figure 2A and Supp Fig. S1). The *hpn-2* was restricted to the *H. pylori* species. In contrast, *hpn* was in addition present in the closely related feline gastric pathogen *Helicobacter acinonychis* [16], and in the two dolphins and whales pathogen *H. cetorum* strains (MIT 99-5656 and MIT 00-7128) [30]. However, contrary to what was previously suggested, no Hpn or Hpn-2 encoding genes were detected in the genomes of *H. mustelae* [20] or *H. felis* [28]. In most genomes, the *hpn* gene was not annotated, likely because it codes for a small protein with very biased amino acid compositions. This is for instance the case for the two *H. cetorum* strains and the *H. acinonychis* strain, in which a hypothetical gene was suggested instead of *hpn* (Figure 3). Among the *H. pylori* strains, the Hpn and Hpn-2 encoding genes present an unexpected strong conservation at the sequence level (Suppl. Figure S1).

Comparison of the phylogeny of *hpn* and *hpn-2* with a reference of *H. pylori* based on HspA and GlmM suggests that the *hpn* gene have emerged in the exclusive common ancestor shared by *H. pylori*, *H. cetorum* and *H. Acinonychis* and that *hpn2* originated in the *H. pylori* lineage (Fig. 2A and B). Interestingly *hpn* and *hpn-2* are located in a genomic region that is highly conserved among these three *Helicobacter* species (Fig. 3). More precisely, these genes surround a conserved cluster of genes composed of a 23S rRNA methyl-transferase, the polysialic acid capsule expression protein KpsF, the RNase J ribonuclease and the 16S rRNA dimethyladenosine transferase (Fig. 3). A close examination of the gene organization in this region reveals an opposite orientation of this gene cluster when comparing that of *H. pylori* with that of *H. cetorum* and *H. acinonychis* strains (Fig. 3). This indicates that a gene inversion has occurred at this gene cluster in the lineage leading to the *H. pylori* species. Therefore, this strongly suggested that this gene inversion has led to a duplication of *hpn* that gave rise to its paralog *hpn-2*.

The restricted distribution and strong conservation of Hpn and Hpn-2 within the *H. pylori* species prompted us to examine the role of these proteins and in particular whether these proteins are important for gastric colonization.

Hpn and Hpn-2 are essential for colonization of the mouse model by *H. pylori*

The role of Hpn and Hpn-2 during *in vivo* gastric colonization was evaluated using the mouse model. Mutants carrying complete deletions of *hpn*, *hpn-2* and of both genes were constructed in strain B128 [19]. The three mutants presented growth rates comparable to that of the parental strain B128 (Supp Fig. S2). Wild type B128 strain or each of the three isogenic mutants were orogastrically inoculated to eight NMRI mice per strain. One month later, colonization was assessed by quantitative cultures of stomach homogenates (Fig. 4). We observed that both the single Δhpn and $\Delta hpn-2$ mutants were strongly affected in their ability to colonize the mouse stomach. The colonization loads of these single mutants were two logs below that of the parental strain and the corresponding geometric mean was at the limit of detection. Importantly, the double mutant $\Delta hpn\Delta hpn-2$ was totally unable to colonize the mouse stomach.

These results revealed for the first time a crucial role of Hpn and Hpn-2 during *in vivo* colonization.

Hpn but not Hpn-2 plays a major role in *H. pylori* resistance to nickel toxicity

Because of the critical importance of Hpn and Hpn-2 for *in vivo* colonization we decide to define their precise function inside the bacterium. The His-rich composition of Hpn and Hpn-2 and previous data prompted us to examine the importance of these proteins in the protection of *H. pylori* against nickel toxicity. This was evaluated with different mutants and plasmid-complemented strains using the disc diffusion assay that we standardized. In addition to the deletion mutants cited above, we constructed a mutant (designated *hpn-2* ΔC_{ter}) containing a chromosomal deletion of the C-terminal Gln-rich region of Hpn-2 (Fig. 1). Inducible *H. pylori* plasmids expressing either Hpn (pHpn) or Hpn-2 (pHpn-2) were used for complementation (Suppl Table S1).

The $\Delta hpn-2$, *hpn-2* ΔC_{ter} mutants and the $\Delta hpn-2$ -pHpn2 complemented strain presented the same nickel resistance as the parental wild type strain (Fig. 5). In contrast, the Δhpn mutant and $\Delta hpn\Delta hpn-2$ double mutant showed an identical significant decrease in nickel resistance as

compared to the parental strain. Transformation of the Δhpn mutant with plasmid pHpn resulted in complementation and restoration of wild type nickel resistance (Suppl Fig. S3). Identical results were obtained with Δhpn , $\Delta hpn-2$ and $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutants of another *H. pylori* isolate, strain 26695 (data not shown).

These data indicate that the Hpn protein is crucial to protect *H. pylori* against nickel toxicity while Hpn-2 is not required for this process.

In vivo protection against bismuth toxicity relies on Hpn but not Hpn-2 or HspA

Bismuth-based therapeutic treatments of *H. pylori* infection are highly efficient, however their *in vivo* target remains unclear. Based on recent *in vitro* data, it has been suggested that the essential HspA protein that contains a C-terminal nickel-binding domain [15] is a major target of Bismuth [17]. Disc diffusion assays with bismuth (1 nmol $C_6H_5BiO_7$) were performed with the Δhpn , $\Delta hpn-2$ and $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutants as well as with the HspA- Δ C mutant in which the C-terminal domain was deleted (our previous work [15]). The Δhpn and $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutants presented diminished resistance to bismuth of the same order, while the $\Delta hpn-2$ and HspA- Δ C mutants presented wild type bismuth resistance (Fig. 6A). This indicates that Hpn is required for protection against bismuth toxicity *in vivo*, possibly by sequestration of this metal. In addition, Hpn-2 and the C-terminal domain of HspA are not required for *in vivo* protection against bismuth toxicity.

To define better the role of Hpn and Hpn-2 in the *H. pylori in vivo* response to metal exposure, the same tests were performed with zinc (4 μ mol $ZnCl_2$), copper (4 μ mol $CuSO_4$), and cobalt (250 nmol $CoCl_2$). Mutants and the parental wild type strain showed identical sensitivity to copper and zinc (data not shown). Surprisingly, the cobalt sensitivities of both Δhpn and $\Delta hpn-2$ mutants were affected but in opposite directions. While the Δhpn mutant is more sensitive to cobalt, the $\Delta hpn-2$ is less susceptible than the parental strain (Fig. 6B). This indicated (i) that Hpn is protecting *H. pylori* against cobalt toxicity, possibly by cobalt sequestration and, (ii) that the presence of Hpn-2 renders the bacterium more sensitive to cobalt.

These data show that Hpn and Hpn-2 are central effectors of the *in vivo* response to metals in *H. pylori*.

Impact of Hpn and Hpn-2 on the *H. pylori* intracellular nickel content

To evaluate the role of Hpn and Hpn-2 in the control of nickel homeostasis in *H. pylori*, the total intracellular nickel content was measured by Induced-Coupled-Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). Nickel was measured in the wild type B128 parental strain, isogenic mutants and complemented strains exposed to NiCl_2 at low (1 μM) or high concentrations (10 μM) during 6 hours as in our previous studies [9]. When bacteria were incubated without nickel, the detectable intracellular nickel was below the detection limit of ICP-OES. When exposed to low nickel concentrations (1 μM), the wild-type strain and the Δhpn mutant contained the same amount of nickel, 0.03 μg of per mg of proteins (Fig. 7). Interestingly, nickel intracellular content was significantly increased in the mutant strains $\Delta hpn-2$ (8 fold), $hpn-2\Delta C_{ter}$ (6 fold) and in the $\Delta hpn\Delta hpn-2$ double mutant (4 fold). Complementation of Δhpn and $\Delta hpn-2$ mutants by plasmids pHpn and pHpn-2, respectively restored wild type nickel content (Supp Fig. S4). This indicates that under these conditions, Hpn-2 is restricting nickel accumulation in the cell, and that its C-terminal Gln-rich region is required for this activity.

When exposed to ten times higher nickel concentrations (10 μM), nickel content of the wild-type strain was accordingly increased ten times to 0.37 μg per mg of proteins (Fig. 7). This content was significantly diminished in the Δhpn mutant that contains a nickel concentration that was about 2.5 fold below that of the wild-type strain. This result clearly indicates that Hpn is required to store large amounts of nickel *in vivo*. Intracellular nickel content of the $\Delta hpn-2$ and the $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutants are twice the values of the wild type strain, while the $hpn-2\Delta C_{ter}$ mutant has wild type nickel content.

These data confirm the inhibitory activity of Hpn-2 on intracellular nickel accumulation which under these conditions is not dependent on Hpn. In addition, it reveals the importance of the C-terminal Gln-rich region of Hpn-2 only at low nickel concentration.

Hpn and Hpn-2 control nickel-dependent urease activation

Given the importance of Hpn and Hpn-2 in the control of the intracellular nickel concentration, we decided to evaluate the importance of these proteins in urease and hydrogenase activities using the single, double and complemented mutants described above (Fig. 8). Hydrogenase activities, measured as before [15], were not altered in the mutant strains. Urease activities were measured by NH_3 production of whole bacteria incubated with 5 mM urea, from a log phase culture grown in BB β medium without added nickel or with 10 μM

NiCl₂. The estimated nickel concentration in BB β medium is about 1 μ M [9]. As expected, urease activity of the wild type strain was enhanced (about 3 fold) by nickel addition. Under nickel-poor conditions, urease activity of the $\Delta hpn-2$ mutant was significantly enhanced (2.5 fold) as compared to the wild type strain, a phenotype that was complemented by pHpn-2 but not observed in the Hpn-2 ΔC_{ter} mutant (Fig. 8 and Supp Fig. S5). This indicates that under nickel-poor conditions Hpn-2 restricts urease activity and its C-terminal is not required for this activity.

In the presence of 10 μ M NiCl₂, urease activities of the Δhpn and $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutants was two-fold lower than that of the wild-type strain that was similar to that of the $\Delta hpn-2$ and $hpn-2\Delta C_{ter}$ mutants. Again, wild type urease activity was restored by complementation of the Δhpn mutant with pHpn (Supp Fig. S5). Thus, Hpn is required for full urease activation under nickel-replete conditions. In addition, since the $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutant had the same phenotype than the single Hpn mutant, we concluded that the two proteins were involved in a common pathway in which Hpn is epistatic on Hpn-2.

Western blotting using anti-UreA antibody was performed to test whether the differences in urease activity of the mutants could be correlated with changes in the amounts of urease structural subunits (Suppl Fig. S6). Aliquots of B128 parental strain, of Δhpn , $\Delta hpn-2$ and $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutants were taken after 4, 8, and 24 hours of culture under the same conditions without or with 10 μ M NiCl₂ and UreA protein amounts were quantified.

Under nickel-poor conditions, UreA protein amounts were similar in all strains tested. As expected, the expression of UreA protein was induced in the presence of nickel (2-fold after 8 hours) in the wild type strain. Surprisingly, under this condition the different mutants presented constitutive high UreA amounts equivalent to the induced amounts of the parental strain. This suggests either an induction of urease expression in the mutants or an earlier activation as compared to the wild-type strain, both hypothesis linking the Hpn and Hpn-2 proteins to the nickel responsive regulation. We concluded that the differences in urease activities displayed by the Δhpn and $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutants are not due to differential amounts of urease but to modifications in the nickel loading into this enzyme.

Protein interaction networks between the nickel trafficking proteins

Previous studies showed that purified Hpn and Hpn2 each form homo-multimers *in vitro* [22,24]. We were therefore interested in assessing whether homo-oligomerization of these proteins also occurred *in vivo*. In addition, given our results indicating that Hpn is epistatic on

Hpn-2, we wanted to test whether Hpn and Hpn-2 interact *in vivo*. This was investigated by a bacterial two-hybrid system [31]. Both *hpn* and *hpn-2* genes were cloned in frame at their 5' or 3' extremities, with fragments encoding either the N-terminal (T25) or the C-terminal part (T18) of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. These constructs were introduced in *E. coli* and the expression of the *lacZ* gene was used as a reporter.

First, β -galactosidase activity assays fully supported the conclusion that Hpn forms homo-oligomers (Fig. 9 and Supp Table S3). The addition of nickel at 1 mM to the *E. coli* strains expressing these fusions did not modify the expression of the reporter gene *lacZ*. Second, no Hpn-2/Hpn-2 interaction could be detected with any combination of plasmids. Third, the following combinations of hybrid proteins scored positive: N-terminal fusion of the T25 to Hpn-2 (T25-Hpn-2) with both N- and C-terminal fusions of Hpn with T18 (T18-Hpn and Hpn-T18). These results indicate that Hpn-2 strongly interacts with Hpn at least under certain conditions (Fig. 9 and Supp Table S3). Finally, in the course of the study, a Hpn*-T18 variant was accidentally generated by PCR in which two residues were mutated, His in position 3 to Leu and His in position 12 to Arg (Fig. 1). As compared to the wild type Hpn-T18 protein, we this variant Hpn*-T18 hybrid protein still strongly interacted with Hpn-T25 and with lesser efficiency with T25-Hpn (Fig. 9 and Supp Table S3). In contrast, the two mutations introduced in Hpn*-T18 completely abolished the interaction with T25-Hpn2.

In conclusion, these data indicate that Hpn can multimerize *in vivo*. No such interaction was observed for Hpn-2 in contrast to *in vitro* data. Most interestingly, we demonstrated that Hpn and Hpn-2 interact *in vivo* and identified two Histidine residues in Hpn that when mutated disrupt this interaction.

Discussion

The relation between metal trafficking and bacterial virulence has attracted large interest these last years. In *H. pylori*, nickel is required for colonization as it is the co-factor of two essential enzymes, the very abundant urease and the [Ni-Fe] hydrogenase. Large amounts of nickel are needed to be acquired by *H. pylori* in order to supply these enzymes with their metal co-factor. To avoid the toxicity of nickel, its intracellular concentration and insertion pathways into the active sites of these enzymes are tightly regulated. In addition to uptake and efflux, cytoplasmic concentrations of transition metals are often controlled by specific storage proteins that can act as detoxification stores and/or as metal reserves that can be mobilized when necessary.

H. pylori expresses three His-rich proteins that were proposed to serve as nickel stores, HspA, Hpn and Hpn-2. We previously showed that HspA is a nickel sequestration protein and a specialized Ni²⁺ chaperone for hydrogenase [15]. Here, we investigated the evolutionary history, the *in vivo* function and role during colonization of two His-rich proteins of *H. pylori*, Hpn and Hpn-2. Proteins with His-rich extensions are found in several bacteria mostly acting as accessory proteins for nickel-enzymes. However, the unusual composition of Hpn and Hpn-2 is unique in bacteria. Hpn contains up to 45% His residues, Hpn-2 has 26% His and 40% Gln.

Evolutionary history of *hpn* and *hpn-2*

We performed a systematic analysis of the distribution and phylogeny of Hpn and Hpn-2. *hpn* and *hpn-2* genes were detected in the 38 *H. pylori* complete genomes available, despite erroneous annotations in the *hpn*-containing region for several strains. Thus, the *hpn* and *hpn-2* genes are part of the *H. pylori* core-genome. The *hpn* and *hpn-2* genes and the corresponding proteins present strong sequence conservation in the different *H. pylori* strains (Fig. 2 and Suppl Fig. S1). Since it has been established that the genome of *H. pylori* is highly variable [32], *hpn* and *hpn-2* conservation suggests the existence of a selective pressure to maintain these sequences. Hpn-homologues were found in *H. acinonychis* and *H. cetorum*, two gastric species that are phylogenetically related to *H. pylori* (Fig. 2 and 3). The absence of Hpn in the other gastric urease positive *Helicobacter* species (*H. felis* and *H. bizzozeronii*) indicates that this protein is not associated with stomachal tropism. Interestingly, Hpn-2 is unique to *H. pylori*. A

close examination of the genetic clusters harboring *hpn* in the three species revealed the most plausible evolutionary origin of the *hpn-2* paralogous gene. Hpn-2 has probably arisen through inversion of the Hpn-associated gene cluster followed by Hpn duplication.

The restricted distribution and strong conservation of Hpn and Hpn-2 within the *H. pylori* species suggests that these proteins either provide a selective advantage for gastric colonization of the human host and/or are associated with virulence.

Hpn and Hpn-2 proteins are required for *in vivo* colonization

We found that each protein was required for full colonization of the mouse model and that the mutant deficient in both Hpn and Hpn-2 was totally unable to establish infection. In view of our data showing the importance of Hpn in nickel storage and regulation of urease activity and Hpn-2 in regulation of nickel accumulation, we propose the following interpretation. During the colonization process, *H. pylori* will be exposed to variations in the bio-availability of nickel and urea. In the acidic gastric lumen, metal solubility is known to be greatly enhanced and consequently *H. pylori* will have to deal with important nickel concentrations. Under these conditions, Hpn is expected to be crucial. We showed that Hpn-2 controls urease activity under low nickel concentrations. When close to the epithelial cells, *H. pylori* encounters less nickel, neutral pH and plasmatic urea supply. Under these conditions, it is probable that Hpn-2 is critical to restrain urease activity and prevent lethal cytoplasmic alkalinization.

It has been recently observed that purified Hpn can assemble *in vitro* into amyloid-like fibers that are cytotoxic to gastric epithelial cell cultures [33]. Amyloid fibers are associated with various human pathologies among which Alzheimer disease (AD). An association between *H. pylori* infection and the development of AD has been proposed but solid epidemiologic data are missing [34,35]. While this hypothesis relates Hpn protein with virulence, the actual existence of such fibers in *H. pylori* secreted or not needs first to be established.

Roles of Hpn and Hpn-2 in the control of intracellular nickel content of *H. pylori*

Purified Hpn and Hpn-2 proteins were reported to bind nickel *in vitro* [22,24]. In agreement with previous work [28,29], we found that Hpn protects *H. pylori* against nickel toxicity. Lower intracellular nickel amounts were accumulated in the Hpn deletion mutant showing that Hpn is indeed sequestering nickel *in vivo*. In contrast, Hpn-2 is not required for protection against the deleterious effects of nickel in *H. pylori*. Surprisingly, intracellular nickel

content measurements showed that Hpn-2 is restricting intracellular nickel accumulation independently of Hpn (Fig. 7). In addition, the C-terminal Gln-rich domain of Hpn-2 is required for this activity only when the cells are exposed to low nickel concentrations. Previous *in vitro* data showed that the Gln-rich region stabilizes the nickel binding in Hpn-2 [26]. Two interpretations can be proposed, Hpn-2 prevents intracellular nickel accumulation by inhibiting its uptake or by enhancing its export. Our results are compatible with Hpn-2 being a protein that stimulates nickel export. Indeed, the full length Hpn-2 protein has the capacity to function at both low and high nickel concentrations while truncation of the Hpn-2 poly-Gln sequence, that is known to reduce its capacity to bind nickel, renders the protein less capable to stimulate nickel export at low doses. Whether Hpn-2 interacts with the CznABC nickel efflux pump [36] or is itself secreted out of the cell remains to be determined. Our results differ from those of a previous study [29] reporting that Hpn-2 and Hpn play a major and a minor role in nickel tolerance, respectively. Noteworthy, Seshadri *et al.* [29] studied mutants in which *hpn* and *hpn-2* genes were interrupted rather than deleted, with N-terminal fragments of both proteins most probably being expressed: in the case of Hpn a fragment with 14 His out of 27, for Hpn-2 a fragment with 26 His out of 27 (shown in Fig. 1). Given the repetitive nature of these proteins and the complex phenotype that we found with the C-terminal deletion of Hpn-2, we believe this is a plausible explanation for the contradictory data.

We are confident that our data are solid since (i) complete deletion mutants were constructed, (ii) the deletion strains were complemented with plasmids expressing the wild type corresponding proteins and (iii) the phenotypes were observed in two strains, BI28 (this work) and 26695 [21] (not shown).

Control of urease activity by Hpn and Hpn-2 proteins

Urease activity was reduced in the Δhpn mutant. Since Hpn appears to bind nickel *in vivo*, we concluded that Hpn is a nickel donor for urease in *H. pylori*. In contrast, the $\Delta hpn-2$ mutant presented enhanced urease activity at low nickel concentrations. These data are consistent with the nickel content measurements in this mutant, and show that increased intracellular nickel concentrations results in more nickel-activated urease. Most interestingly, the $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutant displays the same phenotype than the Δhpn . Thus Hpn is epistatic on Hpn-2, suggesting that the two proteins are involved in a common oriented pathway of nickel trafficking where Hpn-2 acts first followed by Hpn and finally urease. This can be correlated with *in vitro* data showing that Hpn-2 has a lower capacity but a higher affinity for nickel, whereas Hpn presents a

stronger capacity to bind nickel with a lower affinity [22,24]. In support of our model, we found that Hpn and Hpn-2 interact *in vivo* and identified a double His mutant of Hpn that was still able to form homodimers but was deficient in its capacity to interact with Hpn-2 (Fig. 8). A tempting interpretation is that nickel binding to Hpn regulates its interaction with Hpn-2, this remains to be tested.

Nickel incorporation into urease requires the UreE accessory protein that acts as a nickel chaperone. In *H. pylori*, UreE has a unusual poor affinity for nickel and a low number of His residues. We propose that in *H. pylori*, Hpn functionally replaces the nickel chaperone function of UreE. The interaction between Hpn and urease structural or accessory proteins remains to be investigated.

Using Hpn and Hpn-2 as therapeutic targets

Bismuth (Bi^{3+}) is used in combination with antibiotics as an efficient anti-*H. pylori* compound. In agreement with [28], we found that Hpn is protecting *H. pylori* against bismuth toxicity. Since Hpn is essential for colonization, bismuth might act *in vivo* by interfering with the ability of Hpn to transfer nickel to urease.

We observed that Hpn is protecting *H. pylori* against cobalt toxicity, possibly by cobalt sequestration. More surprisingly, we demonstrated that the presence of full length Hpn-2 renders the bacterium more sensitive to cobalt, suggesting that Hpn-2 mediates toxic cobalt transfer to other targets that could either be Hpn itself or Iron-Sulfur cluster-containing proteins known to be inactivated *in vivo* by illegitimate cobalt incorporation [37].

Finally, no nickel containing protein has been described in humans. Therefore, the *H. pylori* nickel trafficking pathways and in particular the essential Hpn and Hpn-2 proteins constitute promising targets for the development of novel anti-*Helicobacter* drugs.

Material and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Plasmids used to create or complement mutants of *H. pylori* were constructed and amplified using *Escherichia coli* strain MC1061 [38] (Suppl. Table S1) grown on solid or liquid Luria-Bertani medium with spectinomycin 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ or chloramphenicol 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for selection of transformants. The *E. coli* strain BTH101 [39] was used as a recipient for the Bacterial two hybrid analysis. The *H. pylori* strains used in this study (Suppl. Table S1) are all derivative from B128 [18,19]. *H. pylori* strains were grown on Blood Agar Base 2 (Oxoid) plates supplemented with 10% defibrinated horse blood and with the following antibiotics-antifungal cocktail: amphotericin B 2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, polymyxin B 0.31 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, trimethoprim 6.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and vancomycin 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Selection of *H. pylori* clones was performed using either kanamycin 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ or chloramphenicol 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, or both when needed. For liquid cultures, we used Brucella broth (BD Difco) supplemented with 0.2% β -cyclodextrin (Sigma) (designated here BB β), the antibiotics-antifungal cocktail and the selective antibiotic. For the metal toxicity assays, bacteria were first grown in liquid Brucella broth supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio), then tested on plates containing Brucella broth and bacto agar (BD Difco) that was supplemented with 10% fetal calf serum and on which the disc with a solution of the metal to be tested was placed. *H. pylori* was grown at 37°C under microaerophilic atmosphere conditions (6% O₂, 10% CO₂, 84% N₂) using an Anoxomat (MART Microbiology) atmosphere generator.

Molecular techniques

Molecular biology procedures were performed according to standard procedures [40] and the supplier (Fermentas) recommendations. NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) and QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) were used for plasmid preparations and *H. pylori* genomic DNA extractions, respectively. PCR were performed either with Taq Core DNA polymerase (MP Biomedicals), or with Phusion Hot Start DNA polymerase (Finnzymes) when the product required high fidelity polymerase. The PCR8/GW/TOPO TA cloning kit (Invitrogen) was used to construct in *E. coli* the *H. pylori* suicide plasmids that served for mutagenesis in *H. pylori*.

Construction of *H. pylori* mutants

Chromosomal deletions of the entire genes encoding Hpn or Hpn-2 and of both genes were performed in strain B128. Despite very strong conservation of these genes with their homologues from *H. pylori* strain 26695 (gene number *hp1432* for *hpn* and *hp1427* for *hpn-2*, [21]), the corresponding regions in the genomes of strain B128 and of its close derivative B8 were surprisingly wrongly annotated [18,19]. Deletions were introduced by allelic exchange using *H. pylori* suicide plasmids (see Suppl Table S1) derived from PCR8/GW/TOPO in which around 600 bp of the 5'-end and the 3'-end regions immediately flanking the open reading frame of the target gene and an antibiotic resistance cassette (non-polar kanamycin cassette [41] or non-polar chloramphenicol cassette) were cloned using PCR fragments generated with the primers indicated in Suppl Table S2. The mutants of *H. pylori* were obtained by natural transformation as described previously [42], with 1 µg of a preparation of the suicide plasmid DNA and selection on the corresponding antibiotic. The $\Delta hpn\Delta hpn-2$ double mutant was constructed in two steps; inactivation of *hpn* with the non-polar chloramphenicol cassette followed by the deletion of *hpn-2* and replacement with the non-polar kanamycin. Deletion of the genes of interest and correct insertion of cassettes were checked up by PCR and sequencing of the gene region. The *H. pylori*/*E. coli* shuttle plasmid vector pLL2157 that allows inducible gene expression in *H. pylori* was used to recomplemented mutants [43]. The empty plasmid and the complementation plasmids (see Suppl Table S1) were introduced in *H. pylori* by conjugation following the procedures described in [44], using *E. coli* MC1061 as a donor strain and *E. coli* GC7 with plasmid pRK2013 as a mobilizer and selection on plates with chloramphenicol 5 µg.mL⁻¹.

Mouse model of colonization

NMRI-specific pathogen-free mice (Charles River Laboratories) were orogastrically inoculated with $1.5 \cdot 10^{10}$ CFU, prepared in 100 µL of peptone broth, of the wild type B128 parental strain and of the Δhpn , $\Delta hpn-2$ and $\Delta hpn\Delta hpn-2$ mutants. As described in [41], one month after inoculation, mice were sacrificed and stomachs were crushed in peptone broth. Viable *H. pylori* colonizing the stomach were enumerated by culture of serial dilutions of homogenized tissue on blood agar plates containing bacitracin (200 µg.mL⁻¹) and nalidixic acid (10 µg.mL⁻¹).

Measurement of Metal sensitivity by disc diffusion assays

H. pylori strains were tested for their sensitivity to nickel, bismuth, cobalt, zinc and copper by the disc agar diffusion method. Therefore, 2.10^6 CFU of each strain were prepared from liquid culture and were spread on plates containing Brucella broth, 1.5% bacto agar and 10% fetal calf serum. Sterile antibiotic assay discs (Whatman) were soaked in either 4 μmol NiCl_2 (Sigma), 250 nmol CoCl_2 (Sigma), 1 nmol Bismuth Citrate (Sigma), 4 μmol ZnCl_2 (Sigma) or 4 μmol CuSO_4 (Sigma) and placed in the center of the plate. The data correspond to at least three independent experiments with two technical replicates per experiment. Growth inhibition diameters were measured after 5 days of culture.

Nickel content measurements by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)

Overnight BB β liquid cultures of *H. pylori* strain were diluted to OD_{600} 0.5 in 6 mL fresh BB β (pH adjusted to 7) with 1 or 10 μM NiCl_2 , each condition in triplicate. Bacteria were incubated for 6 hours at 37°C, then 6 ml of culture were centrifuged at 4000 g at 4°C for 25 min through 400 μL of a 1:2 mixture of the silicone oils AR20/AR200 (Wacker) in order to separate the cells from the medium. Cells were lysed with 400 μL 0.2 M NaOH/1% SDS for 60 min at 95°C. Samples were calibrated by protein concentration measurements with the DC Protein Assay kit (BioRad). Then, the samples were mineralized overnight at 80°C with 300 μL of ultrapure 70% nitric acid (JT Baker) and diluted to 1/20 in ultrapure water. Nickel concentrations were measured by ICP-OES using a Vista MPX spectrometer (Varian). The content of Ni was determined using a curve established with certified ICP grade standards. The measurement of each strain in each condition was performed in triplicates in at least three independent experiments.

Measurement of urease activity

Urease activity of whole *H. pylori* cells was testing by measuring the ammonia production using the Ammonia-Assay Kit (Sigma) as in [45]. *H. pylori* bacteria grown on blood agar plates for 24 hours were inoculated at 0.1 OD_{600} in BB β liquid medium and grown overnight. This preculture was used to inoculate the bacteria at 0.2 OD_{600} in BB β liquid medium supplemented, or not with 10 μM of NiCl_2 . From this culture, log-phase bacteria (0.5 OD_{600}) were harvested and washed once with phosphate-buffered saline (Sigma). Three technical replicates consisting

of 5.10^7 CFU of bacteria were resuspended in 1 mL of buffer (citric acid, 0.1M; Na_2HPO_4 , 0.2 M pH 7) containing 5 mM urea. The data correspond to at least three independent experiments with two technical replicates each time. Aliquots were taken after 10 min of incubation at 37°C and centrifuged to pellet the bacteria. The NH_3 concentration in the supernatant was measured immediately with the ammonia-assay kit according to the manufacturer's recommendations. This assay is based on the following reaction: in the presence of NH_3 , α -ketoglutaric acid and NADPH, the enzyme glutamate dehydrogenase produces glutamate and NADP^+ . The oxidation of NADPH to NADP^+ results in a decrease in the absorbance at 340 nm that is proportional to the concentration of NH_3 . One unit (U) of urease activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μmol urea per min per mg of total proteins.

Bacterial two-Hybrid tests

The Bacterial Two-Hybrid (BACTH) is based on the reconstitution of adenylate cyclase activity in a *cya⁻* *E. coli* strain as a result of the interaction between two proteins: a bait and a prey fused to two separate catalytic domains (T18 and T25) of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. To detect interactions between the proteins of interest (Hpn, Hpn-2), several plasmids were constructed (Sup Table S1) expressing either a N-terminal or a C-terminal fusion of these proteins with the T25 catalytic domain (derived from vectors pNKT25 and pKT25, respectively) or either a N-terminal or a C-terminal fusion with the T18 catalytic domain (derived from vectors pUT18 and pUT18C, respectively). *hpn* and *hpn-2* genes were amplified using B128 chromosomal DNA as a template and 3 different UP/DO pairs of primers (Sup Table S2). The *hpn* and *hpn-2* inserts were digested by *EcoRI* and *PstI* and were cloned into the pUT18, pKT25 pUT18c and pNKT25 plasmids digested by the same enzymes. These procedures yielded the in-frame T18-*hpn* and T18-*hpn-2* (pUT18c), T25-*hpn* and T25-*hpn-2* (pKT25), *hpn*-T18 and *hpn-2*-T18 (pUT18), *hpn*-T25 and *hpn-2*-T25 (pNKT25) translation fusions (see Fig. 9 and Sup Table S1). The two plasmids expressing fusions to be tested were co-transformed in *E. coli* strain BTH101. The screening procedure involved growth of the transformants spread on Luria-Bertani agar plates containing X-Gal with or without IPTG at a final concentration of respectively 0.4% and 0.1 mM. Quantification of the functional interactions was obtained by measurement of the β -galactosidase activity performed in 8 replicates as described in [39]. Negative controls corresponded to strains with plasmids expressing one of the fusion proteins tested against the empty vector used to express the other partner. Positive

controls consisted in a strain containing the plasmid used as a vector to construct the baits and the preys but carrying a GCN4 leucine zipper domain fused with the T18 or T25 domains.

Immuno blotting

Overnight *H. pylori* cultures in BB β were diluted to OD_{600nm} 0.2 in fresh BB β either without added nickel or with 10 μ M NiCl₂. Aliquots were taken after 4, 8 and 24 hours culture. Bacteria were pelleted and frozen before lysis. Immuno blotting was performed on crude extracts after cell lysis in 1% SDS pH 5 according to standard protocols. Protein amounts in the crude extracts were calibrated using the Bradford DC Protein Assay Assay (Biorad) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. 20 μ g of total extracts were separated by 12.5% SDS-PAGE using the Criterion TGX Stain Free Any kD acrylamide gels (BioRad). Gels were blotted on a nitrocellulose membrane (GE healthcare). The *H. pylori* UreA protein was specifically detected with an anti-ureA rabbit polyclonal antibody used at a dilution of 1:5000 [46]. Goat anti-rabbit IgG-HRP mouse human adsorbed (Santa Cruz) were used as secondary antibodies and the detection was achieved with the ECL reagent (Pierce). Band intensity was quantified with a Pharos imager using Image Quant Software (Molecular Dynamics).

Statistical analysis

The Student's *t* test was used to determine significance of the means of the data. The Mann-Whitney test was used for mouse colonization assay to compare geometrical means of colonization loads.

Phylogenetic analyses

Homologues of Hpn and Hpn-2 were searched in the 51 *Helicobacter* genomes available at the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BlastP and tBlastN with default parameters, except the removal of the Low complexity regions filter [47]. The corresponding nucleic sequences were retrieved from the corresponding complete genomes. The *hspA* and *glmM* sequences from *Helicobacter* complete genomes were identified retrieved using the same procedure.

The retrieved sequences were aligned using MAFFT (default parameters) [48]. The resulting alignments were inspected and adjusted using the alignment editor from the MUST package [49]. At this step the *hspA* sequence from *H. pylori* strain SouthAfrica7 was removed

because it clearly showed a horizontal gene transfer from *H. acinonychis* str. Sheeba. Then the *hspA* and *glmM* alignments were combined into a single alignment in order to increase the global phylogenetic signal for the inference of a reference phylogeny of organisms. Similarly, *hpn* and *hpn-2* were combined into a single alignment that was used for the phylogenetic reconstruction. Phylogenetic trees were inferred using the Maximum Likelihood (ML) and the Bayesian (BI) methods implemented in PhyML [50] and MrBayes, respectively. Analyses were performed using the GTR model and a gamma distribution to take into account evolutionary rate variations across sites (four categories and an estimated alpha-parameter). The robustness of the resulting ML tree was assessed using the non-parametric bootstrap approach implemented in PhyML. MrBayes was run with four chains for 1 million generations and trees were sampled every 100 generations. To construct the consensus tree, the first 1500 trees were discarded as “burn-in”.

The genomic regions surrounding the *hpn* and *hpn-2* genes were investigated using the genome browser available at the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>). The putative ORFs present in the genomic region containing *hpn* were detected with the ORF finder tool available at the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>).

Acknowledgments

We thank S. Aubert for her help and interest in this work. S. Roure for her help in the mobilization experiment, S. Backert for the gift of plasmid pRK2013 and Y. Redko for the construction of pPH85 plasmid. We thank S. Aubert, Y. Redko and F. Fischer for fruitful discussions. C. Brochier-Armanet is supported by an Investissement d'Avenir grant (ANR-10-BINF-01-01 "Ancestrom"). J. Gallaud was funded by a PhD fellowship of the French Research Ministry.

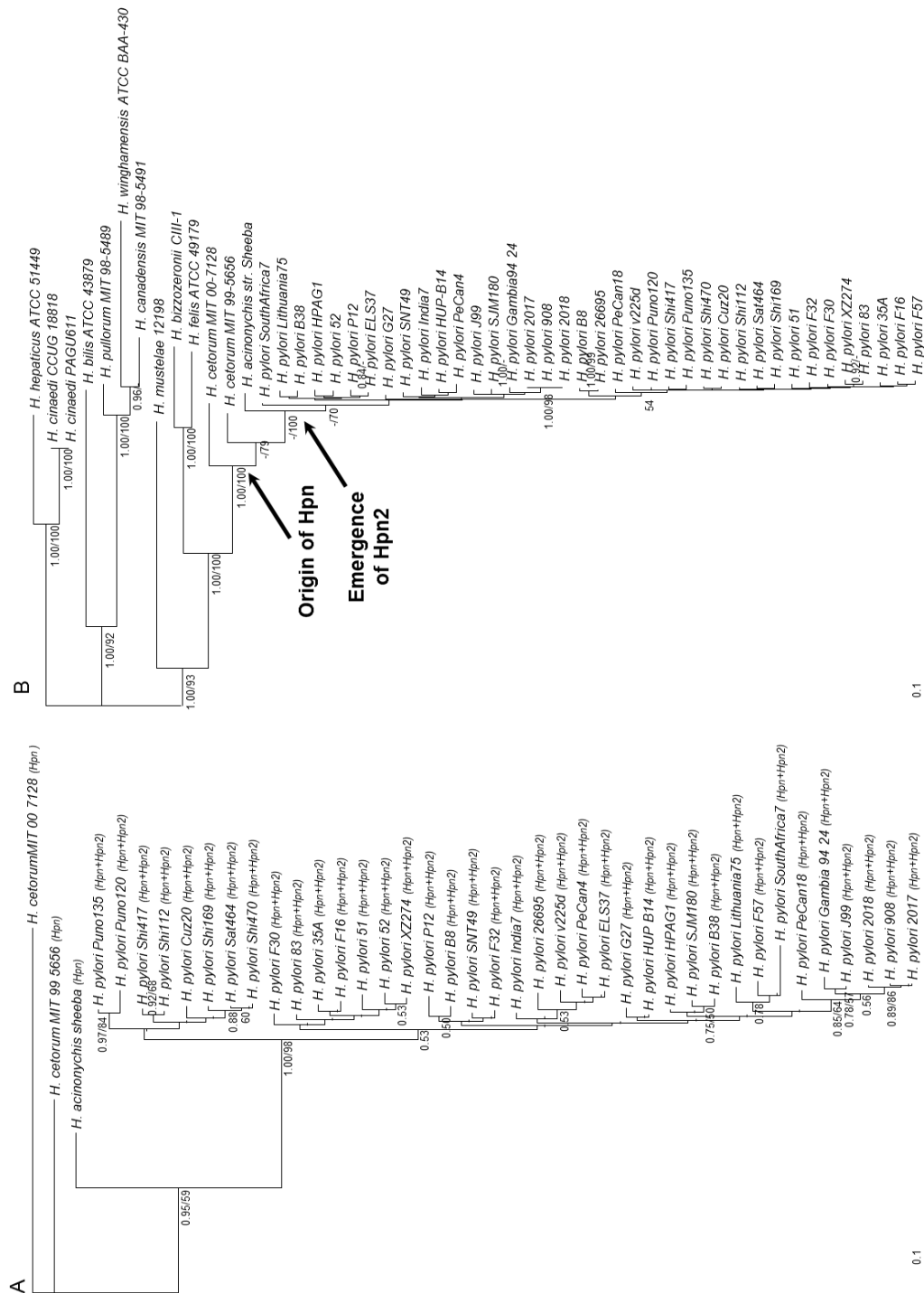


Figure 2. Distribution of Hpn and Hpn-2 encoding genes among the sequenced *Helicobacter* species.

Maximum Likelihood phylogenies of Hpn and Hpn-2 (A) and HspA and GlmM (B). The scale bars represent the inferred number of substitution per site. The emergence of hpn and hpn2 is indicated by black arrows. Numbers at nodes correspond to posterior probabilities and bootstrap values estimated by MrBayes and PhyML, respectively. For clarity, only values greater than 0.50 and 50% are shown.

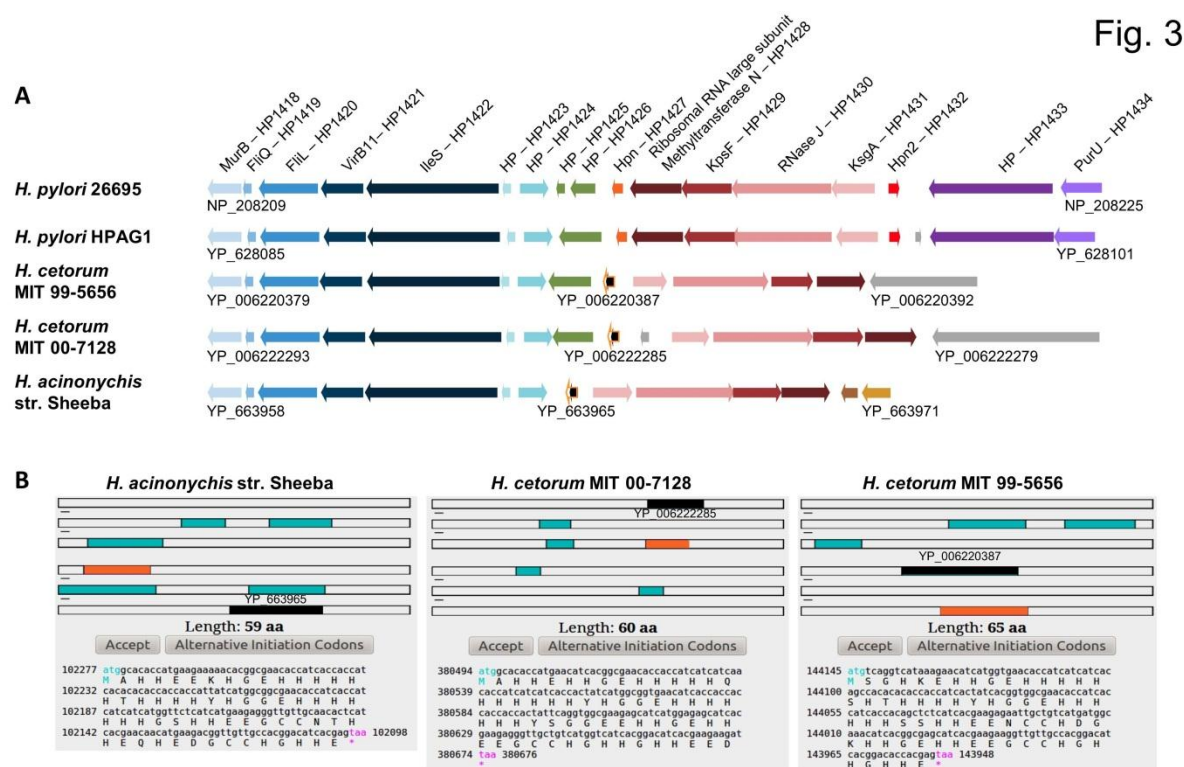


Figure 3. (A) Genomic organization of the regions surrounding *hpn* and *hpn-2* (in orange) in *H. pylori*, *H. cetorum* and *H. acinonychis* according to genome annotations.

This region is not conserved in other *Helicobacter* species. Homologous genes are indicated by similar colors, whereas grey arrows design genes without homologues in other genomes. The black ORF found in *H. cetorum* and *H. acinonychis* likely results from an annotation error and is overlapping the *hpn* homologue present in these genomes that is represented by an empty orange arrow. (B) Details of the regions containing according to ORF finder. The *hpn* gene is indicated in orange, whereas the ORFs annotated in the genomes are indicated in black.

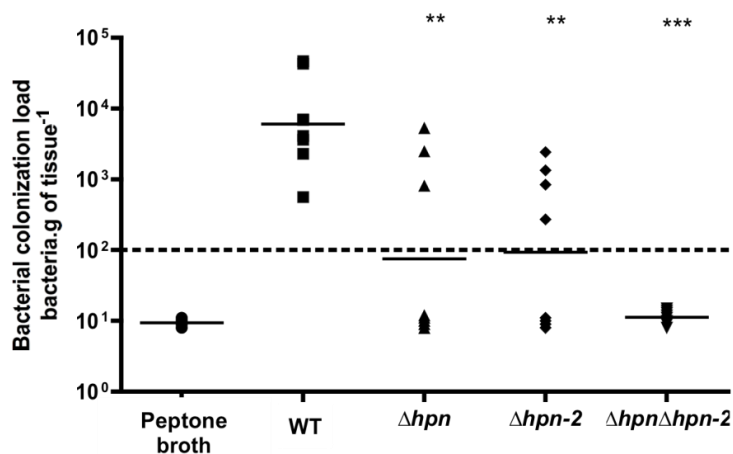


Figure 4. Hpn and Hpn-2 are required for mouse colonization by *H. pylori* BI28 strain.

Each point corresponds to the colonization load for one mouse, with the strain indicated below. Horizontal bars represent the geometric means of the colonization load for the wild type and each mutant. The detection limit is shown by a dashed horizontal line. *** indicates that the standard deviation of the value is significantly different from that of the wild type strain ($P < 0.01$).

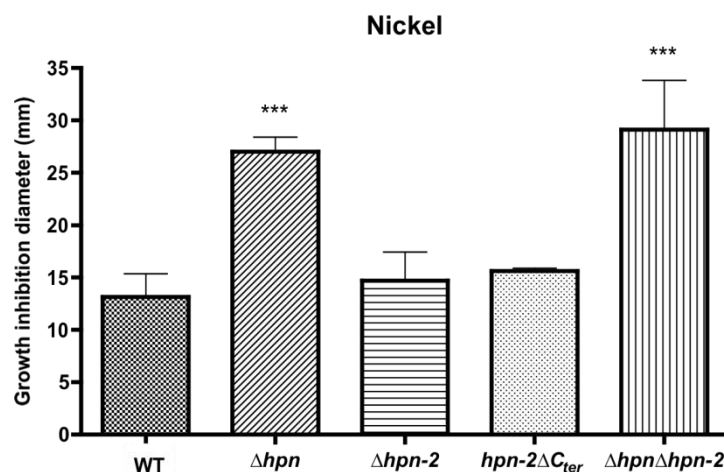


Figure 5. Effect of nickel on the *in vitro* growth of *H. pylori* B128 wild type strain and isogenic mutants.

Disc diffusion assays were performed on Brucella Agar plates with 4 μ mole of $NiCl_2$ on the disc for *H. pylori* B128 wild type strain (squared bar) and the following mutant strains, Δhpn (diagonal striped bar), $\Delta hpn-2$ (horizontal striped bar), $\Delta hpn\Delta hpn-2$ (vertical striped bar) and $hpn-2\Delta C_{ter}$ (dotted bar). The data correspond to the mean value of three independent experiments with at least triplicate tests for each strain. *** indicates that the standard deviation of the value is significantly different from that of the wild type strain ($P < 0.01$).

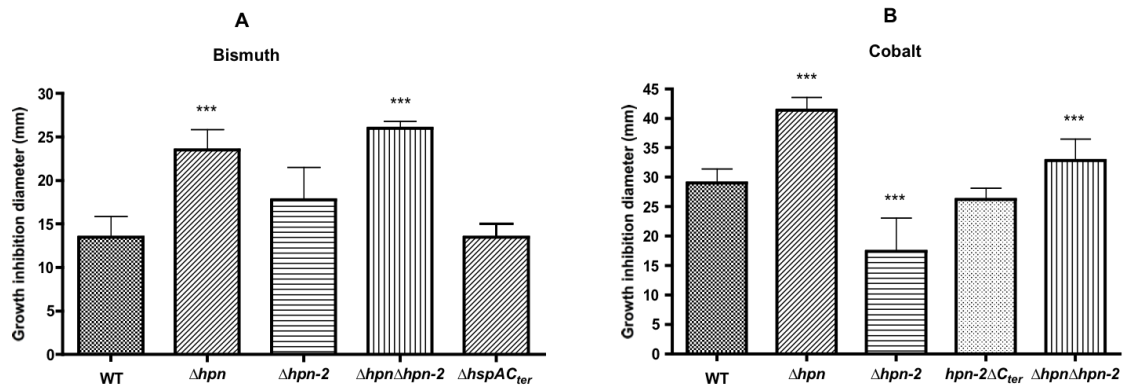


Figure 6. Effect of cobalt and bismuth on *in vitro* growth of *H. pylori* B128 wild type strain and isogenic mutants.

Disc diffusion assays were performed on Brucella Agar plates with 1 nmol of Bismuth Citrate (panel A) or 250 nmol of CoCl_2 (panel B) on the disc for *H. pylori* B128 wild type strain (squared bar) and the following mutant strains, Δhpn (diagonal striped bar), $\Delta hpn-2$ (horizontal striped bar), $\Delta hpn\Delta hpn-2$ (vertical striped bar), $hspA\Delta C_{ter}$ (horizontal striped bar) and $hpn-2\Delta C_{ter}$ (dotted bar). The data correspond to the mean value of three independent experiments with at least triplicate tests for each strain. *** indicates that the standard deviation of the value is significantly different from that of the wild type strain ($P < 0.01$).

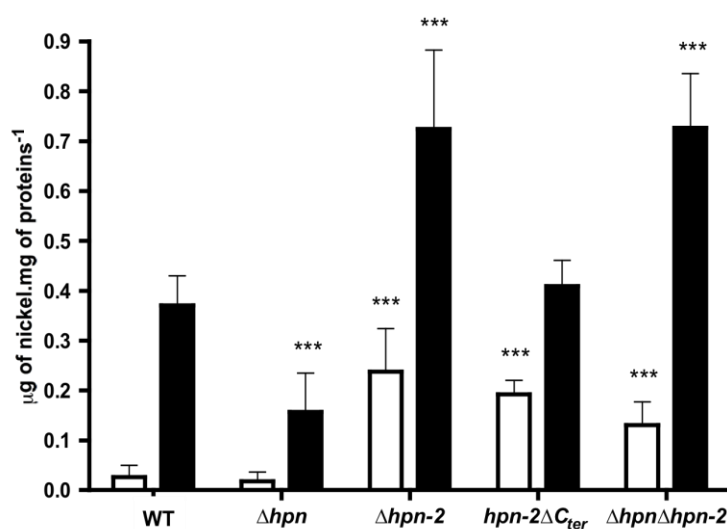


Figure 7. Intracellular nickel content of *H. pylori* B128 wild type strain and isogenic mutants incubated during 6 hours in Brucella β -cyclodextrin medium in the presence of 1 μ M NiCl₂ (white bars) or of 10 μ M NiCl₂ (black bars).

The identity of each strain is indicated below the bars. Nickel amounts were measured by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) and expressed in μ g of nickel. mg of proteins⁻¹. The data correspond to the mean value of three independent experiments for each strain under each condition with each measurement in triplicate. *** indicates that the standard deviation of the mean value is significantly different from that of the wild type strain ($P < 0.01$).

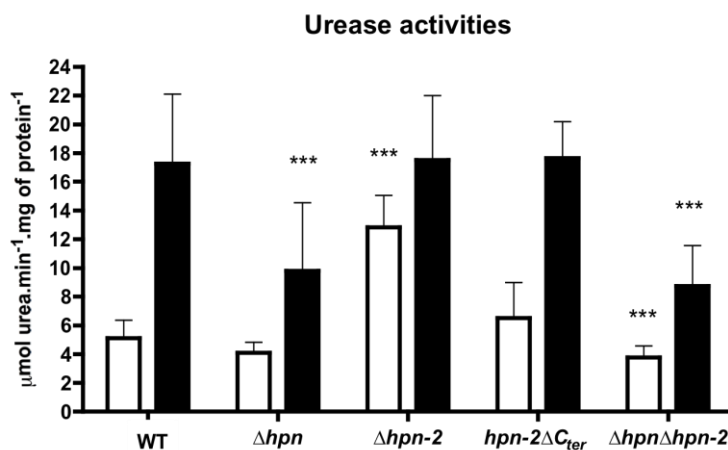


Figure 8. Urease activity of *H. pylori* B128 wild type strain and isogenic mutants grown in Brucella β -cyclodextrin medium without added nickel (white bars) or with 10 μ M nickel (black bars).

The identity of each strain is indicated below the bars. Urease activity is expressed as μ mol of urea hydrolyzed $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein. Four independent experiments were performed for each strain under each condition, every point corresponds to the mean value from triplicates. *** indicates that the standard deviation of the value is significantly different from that of the wild type strain ($P < 0.01$).

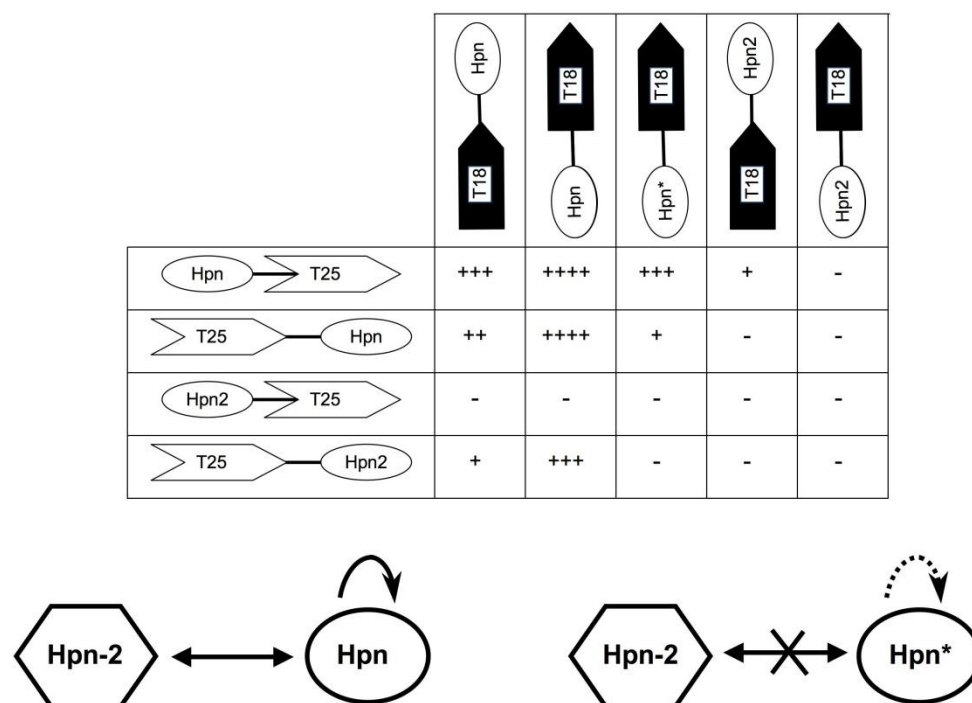


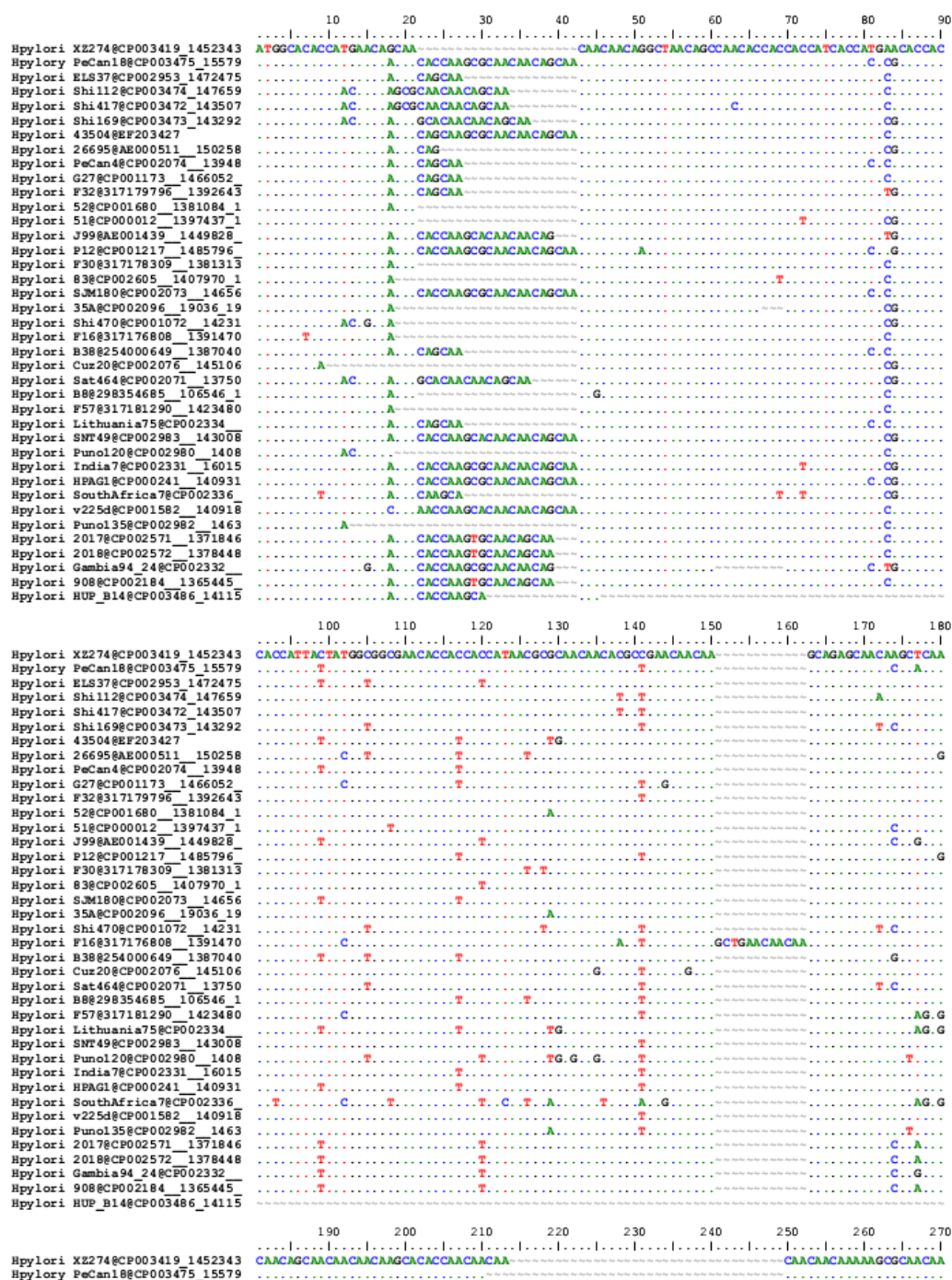
Figure 9. Hpn forms homo-oligomers and interacts with Hpn-2 *in vivo*.

The different constructions used to test the interactions between Hpn, its mutated form Hpn* and Hpn-2 by BACTH are presented. T18 and T25 correspond to the two fragments of the adenylate cyclase and the extremity at which the fusion was made (Nter or Cter) is shown by large arrows. ++++ corresponds to β -galactosidase expressed in Miller units that are > 3,000 U, +++ between 2,000 and 3,000 U, ++, 1,000 U and + between 250 and 550 U. The β -galactosidase activity values for the interactions are in Suppl Table 3. A scheme summarizing the observed interactions is presented below the results, the dotted arrow indicates that the β -galactosidase value for the Hpn*-Hpn interaction is diminished, the cross that the interaction is abolished.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Hacinonychis sheebsaAM260522_1	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGAACAC	---CATCACCACCATCACACACACACACCATAT	CATCGGCGGGAACACCATCAC						
Hoetorum MIT_99_56568CP003479	ATGTTCAGGTCTAAAGAACATCATGGTGAACACCAT	CATCATCACAGCCACACACACACCATCAGT	TATCAGCGGTGGCAACACCATCAC						
Hoetorum MIT_00_71288CP003479	ATGGGCAACCATGAAGAACACCGGCGAACACAC	---CATCATCATCAACACCATCATCATCACCAC	TATCATCGGCGGTGAACATCACAC						
Hpylari Puno1208CP002980_14029	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCAACACACACACCATCAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari Sat4648CP002071_136933	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGTGAACAC	---CACCATCACCATCAACACACACACCATAT	CATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari Shi4708CP001072_141749	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGTGAACAC	---CACCATCACCATCAACACACACACCATAT	CATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari Cuz208CP002076_1445391	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGTGAACAC	---CACCATCACCATCAACACACACACCATAT	CATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari Puno1358CP002982_14577	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCAACACACACACCATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari SNT498CP002983_1424392	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCAACACACACACCATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari 838CP002605_1402296_14	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAT	CACCCACCATCATCATCAACACACACCATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari 20178CP002571_1371395	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGATC	CACCCACCATCATCAACACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari F578317181290_1417897	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAC	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari F328317179796_1387066	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCAACACACACCATATAC	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari F308317178309_1375739	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAC	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari F168317176808_1385886	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAC	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari Gambia94_248CP002332_1	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari Lithuania758CP002334_1	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGATC	CACCCACCATCATCAACACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari India78CP002031_160726	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari 35A8CP002096_13430_136	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAC	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari PeCan48CP002074_138924	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari SJM1808CP002073_146009	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari 908CP002184_1364994_1	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGATC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari B88298354685_111911_11	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGATC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari 528CP001680_1375501_13	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAC	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari 518CP000012_1391854_13	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAC	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari B38825400649_1381436	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari HPAG18CP000241_1403710	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari J998AE001439_1449377_1	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari 266958AE000511_1496992	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari G278CP001173_1460508_1	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari v225d8CP001582_1403586	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari P128CP001217_1480206_1	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari 2018CP002572_1377934	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari SouthAfrica78CP002336	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari X22748CP003419_1446938	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari HUP_B148CP003486_14064	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari PeCan188CP003475_15584	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari EIS378CP002953_1472005	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGCGGACAC	CACCCACCATCATCATCAACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari shi1128CP003474_147119	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGTGAACAC	---CACCATCACCATCAACACACACCATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari Shi4178CP003472_142966	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGTGAACAC	---CACCACCATCATCAACACACCATATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
Hpylari Shi1698CP003473_142752	ATGGGCAACCATGAAGAAACACCGGTGAACAC	---CACCACCATCATCAACACACCATATATAT	CATCATCGGCGGTGAACACCATCAT						
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
Hacinonychis sheebsaAM260522_1	CATCATCATCATGGTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAC	---ACTCATCAGGAACACAT	---GAAGACGGTTGTGCCACGGG					
Hoetorum MIT_99_56568CP003479	CATCACCAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGATTTGTG	TGTCATGATGGCAACATCATCGGCGGACCAT	CACGAGAAAGGTTGTGCCACGGG					
Hoetorum MIT_00_71288CP003479	CACCCACACCATATTCAGGTGGCGAAGAG	---CATCATGGAGAGCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGTATGGT						
Hpylari Puno1208CP002980_14029	CACCCACACCATCATCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG					
Hpylari Sat4648CP002071_136933	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari Shi4708CP001072_141749	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari Cuz208CP002076_1445391	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari Puno1358CP002982_14577	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari SNT498CP002983_1424392	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari 838CP002605_1402296_14	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari 20178CP002571_1371395	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari F578317181290_1417897	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari F328317179796_1387066	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari F308317178309_1375739	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari F168317176808_1385886	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari Gambia94_248CP002332_1	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari Lithuania758CP002334_1	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari India78CP002031_160726	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari 35A8CP002096_13430_136	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari PeCan48CP002074_138924	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari SJM1808CP002073_146009	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari 908CP002184_1364994_1	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari B88298354685_111911_11	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari 528CP001680_1375501_13	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari 518CP000012_1391854_13	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari B38825400649_1381436	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari HPAG18CP000241_1403710	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari J998AE001439_1449377_1	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari 266958AE000511_1496992	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari G278CP001173_1460508_1	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari v225d8CP001582_1403586	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari P128CP001217_1480206_1	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari 2018CP002572_1377934	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari SouthAfrica78CP002336	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari X22748CP003419_1446938	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari HUP_B148CP003486_14064	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari PeCan188CP003475_15584	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari EIS378CP002953_1472005	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari shi1128CP003474_147119	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari Shi4178CP003472_142966	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				
Hpylari Shi1698CP003473_142752	CACCCACAC	---AGCTTCTCATCATGAAGAGGGT	TTGTGCAAG	---ACTAGCGATGTCATCATCAAGAAAGGGT	TGTGTGCCACGGG				

		10	20	30	40	50	60	70	80	90
Hpylori	XZ274@CP003419_1452343	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	PeCan18@CP003475_15579	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	ELS37@CP002953_1472475	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Shi112@CP003474_147659	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Shi4178@CP003472_143507	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Shi169@CP003473_143292	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	435048@F203427	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	266958@B000511_150258	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	PeCan48@CP002074_13948	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	G278@CP001173_1466052	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	F328317179796_1392643	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	528@CP001680_1381084_1	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	518@CP000012_1397437_1	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	J998A@B01439_1449828	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	P128@CP001217_1485796	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	F308317178309_1381313	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	838@CP002605_1407970_1	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	SUM180@CP002073_14656	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	35A@CP002096_19036_19	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Shi4708@CP001072_14231	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	F168317176808_1391470	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	B38825400649_1387040	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Cuz20@CP002076_145106	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Sat4648@CP002071_13750	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	B88298354685_106546_1	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	F578317181290_1423480	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Lithuania75@CP002334	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	SNF49@CP002983_143008	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Punol20@CP002980_1408	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	India78@CP002331_16015	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	HPAG1@CP000241_140931	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	SouthAfrica78@CP002336	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	v225d@CP001582_140918	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Punol35@CP002982_1463	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	20178@CP002571_1371846	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	2018@CP002572_1378448	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	Gambia94_24@CP002332	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	908@CP002184_1365445	ATGGCACACCATGACACGAA								
Hpylori	HUP_B14@CP003486_14115	ATGGCACACCATGACACGAA								
		100	110	120	130	140	150	160	170	180
Hpylori	XZ274@CP003419_1452343	CAACATATACATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	PeCan18@CP003475_15579	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	ELS37@CP002953_1472475	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Shi112@CP003474_147659	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Shi4178@CP003472_143507	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Shi169@CP003473_143292	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	435048@F203427	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	266958@B000511_150258	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	PeCan48@CP002074_13948	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	G278@CP001173_1466052	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	F328317179796_1392643	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	528@CP001680_1381084_1	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	518@CP000012_1397437_1	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	J998A@B01439_1449828	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	P128@CP001217_1485796	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	F308317178309_1381313	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	838@CP002605_1407970_1	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	SUM180@CP002073_14656	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	35A@CP002096_19036_19	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Shi4708@CP001072_14231	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	F168317176808_1391470	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	B38825400649_1387040	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Cuz20@CP002076_145106	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Sat4648@CP002071_13750	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	B88298354685_106546_1	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	F578317181290_1423480	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Lithuania75@CP002334	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	SNF49@CP002983_143008	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Punol20@CP002980_1408	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	India78@CP002331_16015	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	HPAG1@CP000241_140931	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	SouthAfrica78@CP002336	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	v225d@CP001582_140918	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Punol35@CP002982_1463	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	20178@CP002571_1371846	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	2018@CP002572_1378448	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	Gambia94_24@CP002332	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	908@CP002184_1365445	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
Hpylori	HUP_B14@CP003486_14115	CAACATATATATGGGGGAAACACCA								
		190	200	210	220	230	240	250	260	270
Hpylori	XZ274@CP003419_1452343	CAACAGCAACCAACAGCACACCA								
Hpylori	PeCan18@CP003475_15579	CAACAGCAACCAACAGCACACCA								

Hpylori	ELS37@CP002953	1472475	CACAGCAA	CAACACAAAGGCAACAA
Hpylori	Shi112@CP003474	147659	CACAGCAAACACAGCACACAA	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Shi417@CP003472	143507	CACAGCAAACACAGCACACAA	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Shi169@CP003473	143292	CACAGCAAACACAGCACACAA	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	43504@EF203427		CACACAA	CAACACAAAGGCGAGCAA
Hpylori	26695@AE000511	150258	CACAGCAAACACAGCACACAA	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	PeCan4@CP002074	13948	CACAGCAAACACAGCACACAA	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	G27@CP001173	1466052	CACAGCAAACACAGCACACAG	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	F32@CP00179796	1392643	CACACAAACAA	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	52@CP001680	1381084	1	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	518@CP000012	1397437	1	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	J99@AE001439	1449828		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	P12@CP001217	1485796		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	F30@CP001718309	1381313		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	B3@CP002605	1407970	1	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	SJM180@CP002073	14656		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	35A@CP002096	19036	19	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Shi470@CP001072	14231		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	F16@CP0017176808	1391470		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	B38@254000649	1387040		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Cuz20@CP002076	145106		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Sat464@CP002071	13750		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	B8@298354685	106546	1	CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	F57@CP0017181290	1423480		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Lithuania75@CP002334			CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	SN749@CP002983	143008		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Puno120@CP002980	1408		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	India78@CP002331	16015		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	HPAG1@CP000241	140931		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	SouthAfrica78@CP002336			CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	v225d@CP001582	140918		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Puno135@CP002982	1463		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	2017@CP002571	1371846		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	2018@CP002572	1378448		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	Gambia94_24@CP002332			CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	908@CP002184	1365445		CAACACAAAGGCGAACAA
Hpylori	HUP_B14@CP003486	14115		CAACACAAAGGCGAACAA
				280
Hpylori	XZ274@CP003419	1452343	CAAAACCAAAATAT
Hpylori	PeCan18@CP003475	15579		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	ELS37@CP002953	1472475		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Shi112@CP003474	147659		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Shi417@CP003472	143507		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Shi169@CP003473	143292		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	43504@EF203427			CAAAACCAAAATAT
Hpylori	26695@AE000511	150258		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	PeCan4@CP002074	13948		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	G27@CP001173	1466052		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	F32@CP00179796	1392643		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	52@CP001680	1381084	1	CAAAACCAAAATAT
Hpylori	518@CP000012	1397437	1	CAAAACCAAAATAT
Hpylori	J99@AE001439	1449828		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	P12@CP001217	1485796		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	F30@CP001718309	1381313		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	B3@CP002605	1407970	1	CAAAACCAAAATAT
Hpylori	SJM180@CP002073	14656		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	35A@CP002096	19036	19	CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Shi470@CP001072	14231		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	F16@CP0017176808	1391470		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	B38@254000649	1387040		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Cuz20@CP002076	145106		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Sat464@CP002071	13750		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	B8@298354685	106546	1	CAAAACCAAAATAT
Hpylori	F57@CP0017181290	1423480		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Lithuania75@CP002334			CAAAACCAAAATAT
Hpylori	SN749@CP002983	143008		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Puno120@CP002980	1408		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	India78@CP002331	16015		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	HPAG1@CP000241	140931		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	SouthAfrica78@CP002336			CAAAACCAAAATAT
Hpylori	v225d@CP001582	140918		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Puno135@CP002982	1463		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	2017@CP002571	1371846		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	2018@CP002572	1378448		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	Gambia94_24@CP002332			CAAAACCAAAATAT
Hpylori	908@CP002184	1365445		CAAAACCAAAATAT
Hpylori	HUP_B14@CP003486	14115		CAAAACCAAAATAT



```
Hpylori ELS37@CP002953_1472475 .....A.....
Hpylori Shi112@CP003474_147659 .....G.....
Hpylori Shi417@CP003472_143507 .....G.....
Hpylori Shi169@CP003473_143292 .....A.....
Hpylori 43504@EF203427 .....A.....
Hpylori 26695@AE000511_150258 .....G.....
Hpylori PeCan4@CP002074_13948 .....A.....
Hpylori G27@CP001173_1466052 .....G.....
Hpylori F32@317179796_1392643 .....A.....
Hpylori 52@CP001680_1381084_1 .....G.....
Hpylori 51@CP000012_1397437_1 .....A.....
Hpylori J99@AE001439_1449828 .....A.....
Hpylori P12@CP001217_1485796 .....T.....
Hpylori F30@317178309_1381313 .....AGT.....G.....
Hpylori 83@CP002605_1407970_1 .....G.....
Hpylori SJM180@CP002073_14656 .....G.....
Hpylori 35A@CP002096_19036_19 .....G.....
Hpylori Shi470@CP001072_14231 .....G.....
Hpylori F16@317176808_1391470 .....A.....
Hpylori B38@254000649_1387040 .....C.....
Hpylori Cur20@CP002076_145106 .....C.....
Hpylori Sat464@CP002071_13750 .....CAACAGCACACACACACACACAGCACCAA.....
Hpylori B8@298354685_106546_1 .....G.....
Hpylori F57@317181290_1423480 .....AGT.....GCA.....
Hpylori Lithuania75@CP002334 .....AGT.....C.TG.A.....CGAGCACAA.....GTCACACACAG.....
Hpylori SNT49@CP002983_143008 .....AGC.....
Hpylori Punol20@CP002980_1408 .....G.....
Hpylori India78@CP002331_16015 .....AGT.....G.....
Hpylori HPAG1@CP000241_140931 .....AGT.....G.....
Hpylori SouthAfrica78@CP002336 .....AGT.....G.....
Hpylori v225d@CP001582_140918 .....AGT.....G.....
Hpylori Punol35@CP002982_1463 .....AGT.....G.....
Hpylori 2017@CP002571_1371846 .....G.....
Hpylori 2018@CP002572_1378448 .....G.....
Hpylori Gambia94_24@CP002332 .....C.....A.....C.....
Hpylori 908@CP002184_1365445 .....G.....
Hpylori HUP_B14@CP003486_14115 .....A.....

280
.....|.....|
CAAAACCAATAT
Hpylori XE274@CP003419_1452343 .....
Hpylory PeCan18@CP003475_15579 .....
Hpylori ELS37@CP002953_1472475 .....G.....
Hpylori Shi112@CP003474_147659 .....G.....
Hpylori Shi417@CP003472_143507 .....
Hpylori Shi169@CP003473_143292 .....
Hpylori 43504@EF203427 .....
Hpylori 26695@AE000511_150258 .....
Hpylori PeCan4@CP002074_13948 .....
Hpylori G27@CP001173_1466052 .....
Hpylori F32@317179796_1392643 .....
Hpylori 52@CP001680_1381084_1 .....
Hpylori 51@CP000012_1397437_1 .....
Hpylori J99@AE001439_1449828 .....
Hpylori P12@CP001217_1485796 .....
Hpylori F30@317178309_1381313 .....
Hpylori 83@CP002605_1407970_1 .....
Hpylori SJM180@CP002073_14656 .....
Hpylori 35A@CP002096_19036_19 .....
Hpylori Shi470@CP001072_14231 .....
Hpylori F16@317176808_1391470 .....
Hpylori B38@254000649_1387040 .....
Hpylori Cur20@CP002076_145106 .....
Hpylori Sat464@CP002071_13750 .....
Hpylori B8@298354685_106546_1 .....
Hpylori F57@317181290_1423480 .....
Hpylori Lithuania75@CP002334 .....
Hpylori SNT49@CP002983_143008 .....
Hpylori Punol20@CP002980_1408 .....
Hpylori India78@CP002331_16015 .....
Hpylori HPAG1@CP000241_140931 .....
Hpylori SouthAfrica78@CP002336 .....
Hpylori v225d@CP001582_140918 .....
Hpylori Punol35@CP002982_1463 .....
Hpylori 2017@CP002571_1371846 .....
Hpylori 2018@CP002572_1378448 .....
Hpylori Gambia94_24@CP002332 .....
Hpylori 908@CP002184_1365445 .....
Hpylori HUP_B14@CP003486_14115 .....
```

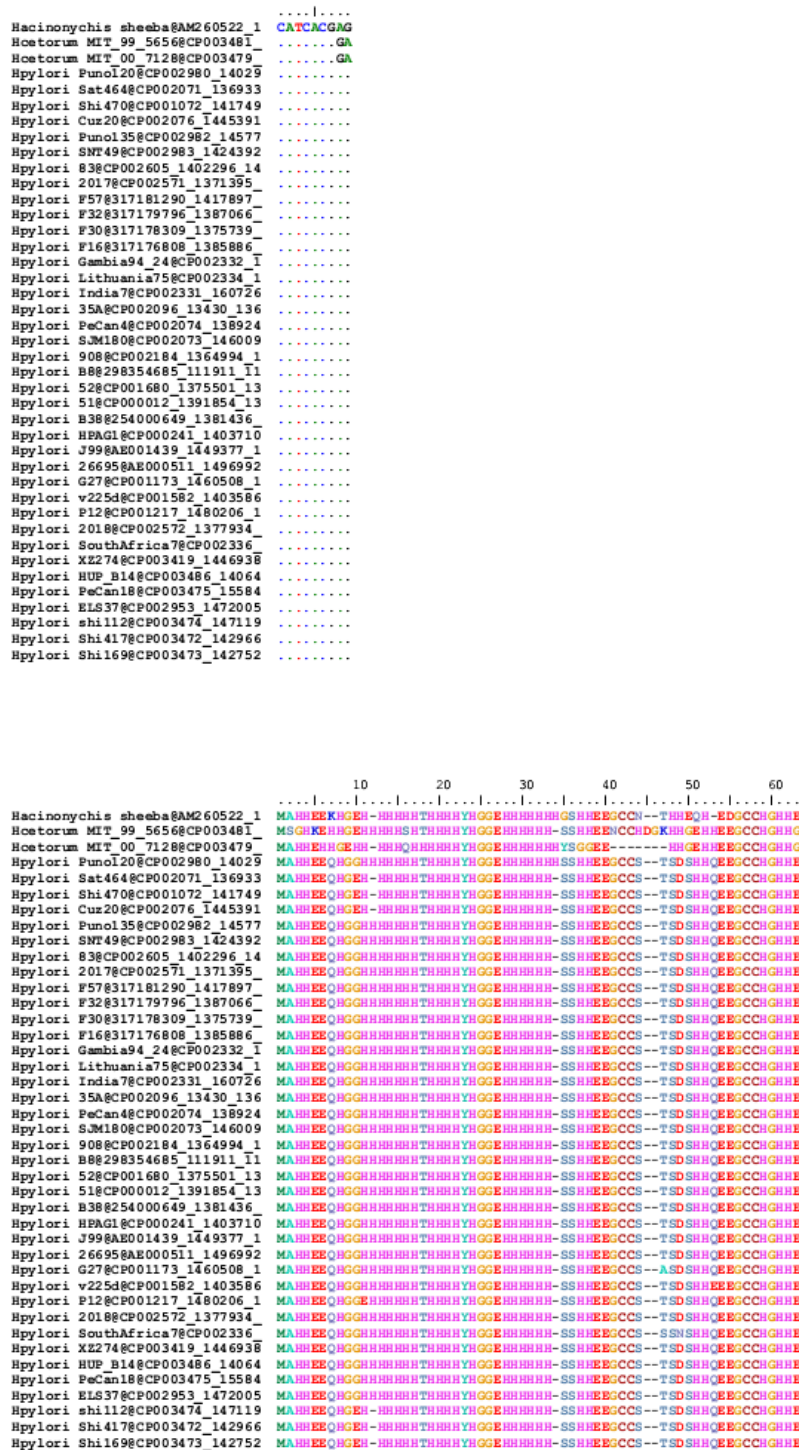
135


```

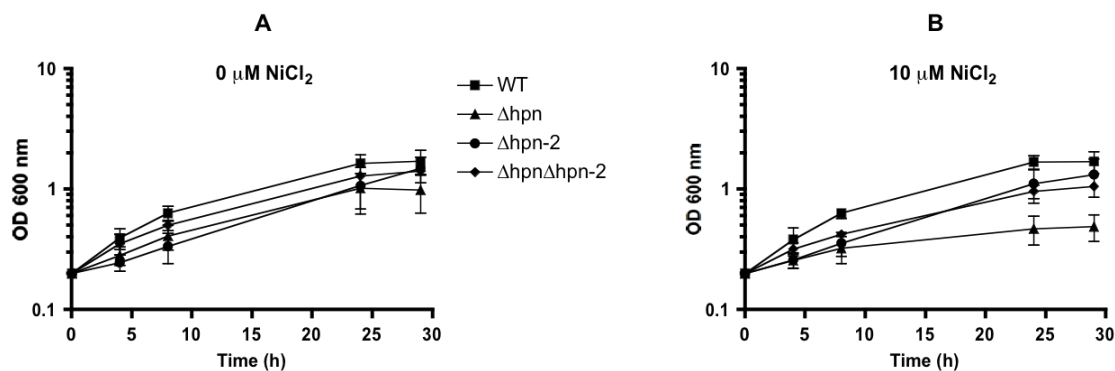
.....|.....
Hacinonychis sheeba@AM2 60522_1 CATCACGAG
Hcoetorum MIT_99_5656@CP003481 CATCACGGA
Hcoetorum MIT_00_7128@CP003479 CATCACGGA
Hpylori Puno120@CP002980_14029 CATCACGAG
Hpylori Sat464@CP002071_136933 CATCACGAG
Hpylori Shi470@CP001072_141749 CATCACGAG
Hpylori Cuz20@CP002076_1445391 CATCACGAG
Hpylori Puno135@CP002982_14577 CATCACGAG
Hpylori SNT49@CP002983_1424392 CATCACGAG
Hpylori B3@CP002605_1402296_14 CATCACGAG
Hpylori 2017@CP002571_1371395_ CATCACGAG
Hpylori F57@317181290_1417897_ CATCACGAG
Hpylori F32@317179796_1387066_ CATCACGAG
Hpylori F30@317178309_1375739_ CATCACGAG
Hpylori F16@317176808_1385886_ CATCACGAG
Hpylori Gambia94_24@CP002332_1 CATCACGAG
Hpylori Lithuania575@CP002334_1 CATCACGAG
Hpylori India78@CP002331_160726 CATCACGAG
Hpylori 35A@CP002096_13430_136 CATCACGAG
Hpylori PeCan48@CP002074_138924 CATCACGAG
Hpylori S3M180@CP002073_146009 CATCACGAG
Hpylori 908@CP002184_1364994_1 CATCACGAG
Hpylori B8@298354685_111911_11 CATCACGAG
Hpylori 528@CP001680_1375501_13 CATCACGAG
Hpylori 518@CP000012_1391854_13 CATCACGAG
Hpylori B38@254000649_1381436 CATCACGAG
Hpylori HPA61@CP000241_1403710 CATCACGAG
Hpylori J99@AE001439_1449377_1 CATCACGAG
Hpylori 26695@AE000511_1496992 CATCACGAG
Hpylori G27@CP001173_1460508_1 CATCACGAG
Hpylori v225d@CP001582_1403586 CATCACGAG
Hpylori P12@CP001217_1480206_1 CATCACGAG
Hpylori 2018@CP002572_1377934_ CATCACGAG
Hpylori SouthAfrica78@CP002336 CATCACGAG
Hpylori XZ274@CP003419_1446938 CATCACGAG
Hpylori HUP_B14@CP003486_14064 CATCACGAG
Hpylori PeCan18@CP003475_15584 CATCACGAG
Hpylori ELS37@CP002953_1472005 CATCACGAG
Hpylori shi112@CP003474_147119 CATCACGAG
Hpylori Shi417@CP003472_142966 CATCACGAG
Hpylori Shi1698@CP003473_142752 CATCACGAG

```

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Hacinonychis sheebsa@AM2.60522.1	ATGGCACACCATGAGGAAACACCGGCGACAC	CATCACCACCATCACACACACACACCATATATCATGGGGGAGACCATCAC							
Hoetorum MIT_99_56568CP003481	TGGTAACTTTTCTTAACTTTT	AGC							
Hoetorum MIT_00_71288CP003479	CTCCGGAAACCTTTTAACTTTT								
Hpylori Puno120@CP002980_14029	GGCACCTTT								
Hpylori Sat464@CP002071_136933	CTTT								
Hpylori Shi470@CP001072_141749	CTTT								
Hpylori Cux20@CP002076_1445391	CTTT								
Hpylori Puno135@CP002982_14577	GGCACCTTT								
Hpylori SNT49@CP002983_1424392	GGCACCTTT								
Hpylori 83@CP002605_1402296.14	GGTCACCTTT								
Hpylori 2017@CP002571_1371395	GGTCACCTTT								
Hpylori F57@17181290_1417897	GGCACCTTT								
Hpylori F32@17179796_1387066	GGCACCTTT								
Hpylori F30@17178309_1375739	GGCACCTTT								
Hpylori F16@17176808_1385886	GGCACCTTT								
Hpylori Gambia94_24@CP002332.1	GGCACCTTT								
Hpylori Lithuania75@CP002334.1	GGTCACCTTT								
Hpylori India78@CP002331_160726	GGCACCTTT								
Hpylori 35A@CP002096_13430_136	GGCACCTTT								
Hpylori PeCan48@CP002074_138924	GGCACCTTT								
Hpylori SJM180@CP002073_146009	GGCACCTTT								
Hpylori 908@CP002184_1364994.1	GGTCACCTTT								
Hpylori B8@298354685_111911.11	GGTCACCTTT								
Hpylori 52@CP001680_1375501.13	GGCACCTTT								
Hpylori 51@CP000012_1391854.13	GGCACCTTT								
Hpylori B38@254000649_1381436	GGCACCTTT								
Hpylori HPAG1@CP000241_1403710	GGCACCTTT								
Hpylori J99@AE001439_1449377.1	GGCACCTTT								
Hpylori 26695@AE000511_1496992	GGCACCTTT								
Hpylori G27@CP001173_1460508.1	GGCACCTTT								
Hpylori v225d@CP001582_1403586	GGCACCTTT								
Hpylori P12@CP001217_1480206.1	GGTCACCTTT								
Hpylori 2018@CP002572_1377934	GGTCACCTTT								
Hpylori SouthAfrica78@CP002336	GGCACCTTT								
Hpylori XZ274@CP003419_1446938	GGCACCTTT								
Hpylori HUP_B14@CP003486_14064	GGCACCTTT								
Hpylori PeCan18@CP003475_15584	GGCACCTTT								
Hpylori ELS37@CP002953_1472005	GGCACCTTT								
Hpylori Shi112@CP003474_147119	GGCACCTTT								
Hpylori Shi417@CP003472_142966	GGCACCTTT								
Hpylori Shi169@CP003473_142752	GGCACCTTT								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
Hacinonychis sheebsa@AM2.60522.1	CATCATCATCATGGTCTCATCATGAGAGGGTTGTGCAC	ACTCATCAGAACAT	GAAGAGGGTTGTGCACGA						
Hoetorum MIT_99_56568CP003481	CTCACTAAGG	GGG							
Hoetorum MIT_00_71288CP003479	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Puno120@CP002980_14029	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Sat464@CP002071_136933	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Shi470@CP001072_141749	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Cux20@CP002076_1445391	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Puno135@CP002982_14577	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori SNT49@CP002983_1424392	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori 83@CP002605_1402296.14	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori 2017@CP002571_1371395	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori F57@17181290_1417897	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori F32@17179796_1387066	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori F30@17178309_1375739	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori F16@17176808_1385886	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Gambia94_24@CP002332.1	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Lithuania75@CP002334.1	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori India78@CP002331_160726	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori 35A@CP002096_13430_136	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori PeCan48@CP002074_138924	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori SJM180@CP002073_146009	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori 908@CP002184_1364994.1	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori B8@298354685_111911.11	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori 52@CP001680_1375501.13	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori 51@CP000012_1391854.13	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori B38@254000649_1381436	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori HPAG1@CP000241_1403710	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori J99@AE001439_1449377.1	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori 26695@AE000511_1496992	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori G27@CP001173_1460508.1	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori v225d@CP001582_1403586	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori P12@CP001217_1480206.1	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori 2018@CP002572_1377934	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori SouthAfrica78@CP002336	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori XZ274@CP003419_1446938	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori HUP_B14@CP003486_14064	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori PeCan18@CP003475_15584	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori ELS37@CP002953_1472005	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Shi112@CP003474_147119	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Shi417@CP003472_142966	CTCACTAAGG	GGG							
Hpylori Shi169@CP003473_142752	CTCACTAAGG	GGG							

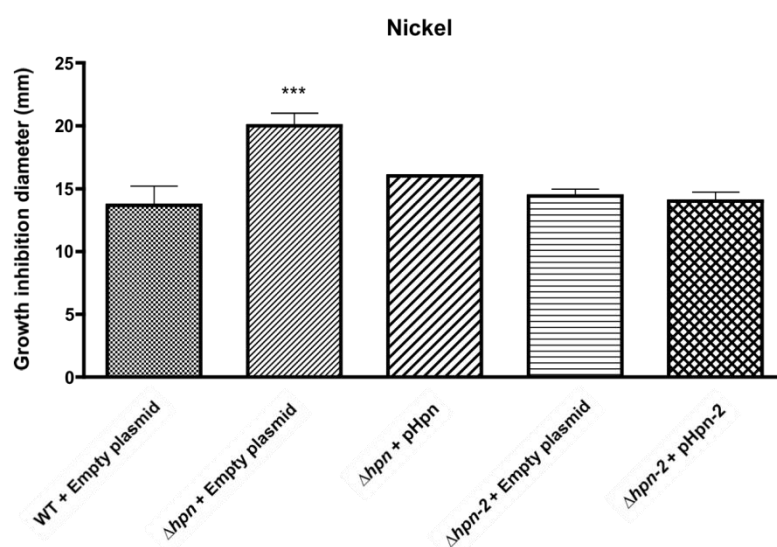


Suppl. Figure S1. Alignments at the nucleic acid and at the amino acid levels of the *hpn* gene (A) and of the *hpn2* gene (B).



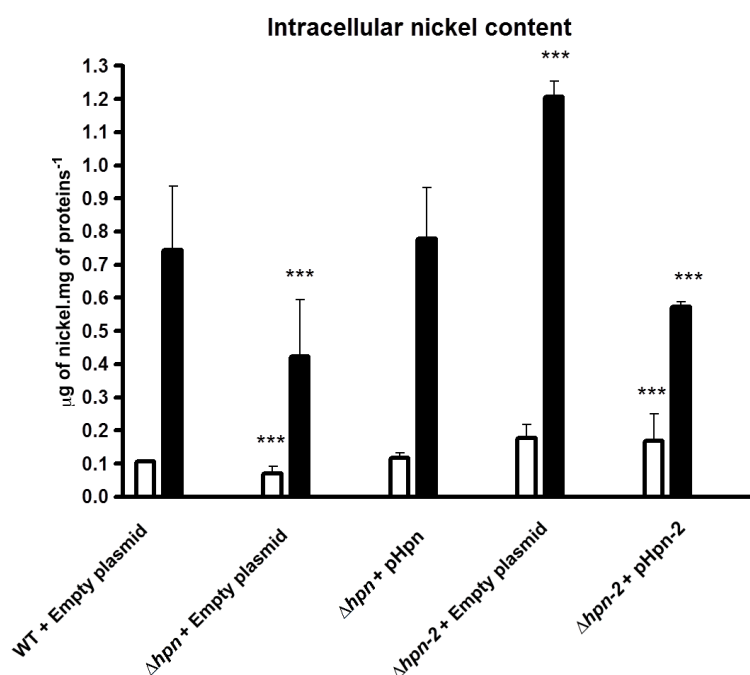
Suppl. Figure S2. Growth of B128 parental strain (■), Δhpn (▲), $\Delta\text{hpn-2}$ (●) and $\Delta\text{hpn}\Delta\text{hpn-2}$ (◆) isogenic mutants, in BB β without nickel (A) or with 10 μM NiCl_2 (B).

Data are expressed as mean values from experiments performed four times for each strain. Errors bars represent the standard deviation.



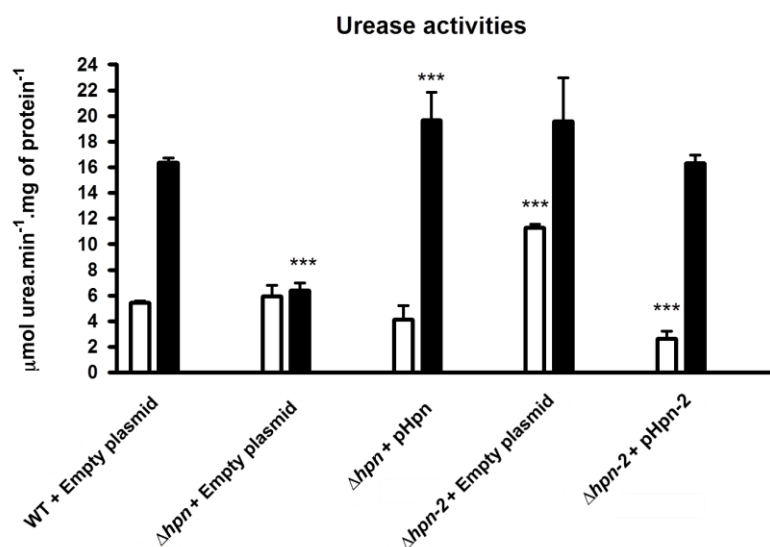
Suppl. Figure S3. Effect of nickel on the *in vitro* growth of *H. pylori* B128 wild type, isogenic mutants and complemented strains.

Disc diffusion assays were performed on Brucella Agar plates with 4 μ mole of NiCl_2 on the disc. Growth inhibition diameter is shown in mm for *H. pylori* B128 wild type strain carrying pPH85 empty vector (squared), Δhpn carrying pPH85 empty vector (left oblique lines), Δhpn carrying pHpn plasmid (left bold oblique lines), $\Delta hpn-2$ carrying pPH85 empty vector (horizontal stripes) and $\Delta hpn-2$ carrying pHpn-2 plasmid (crossed stripes). The data correspond to the mean value of three independent experiments with at least triplicate tests for each strain. Errors bars represent the standard deviation. *** indicates that the standard deviation of the value is significantly different from that of the wild type strain ($P < 0.01$).



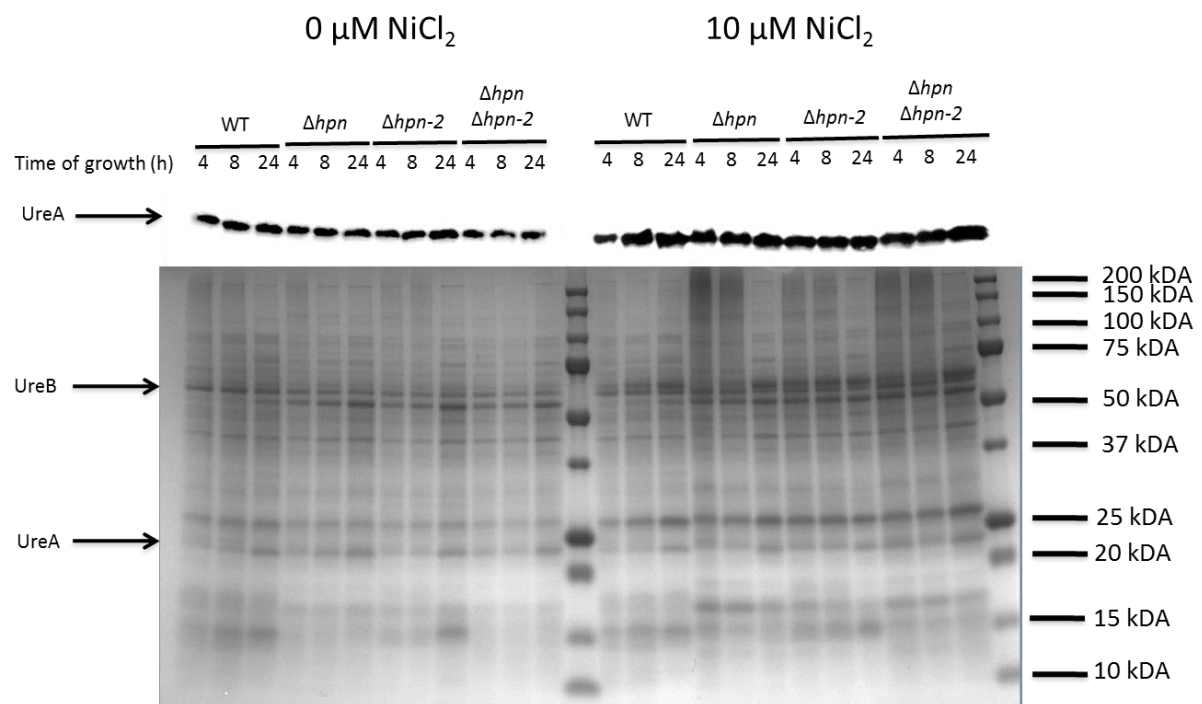
Suppl. Figure S4. Intracellular nickel content of *H. pylori* B128 wild type strain carrying pPH85 empty vector, Δhpn carrying pPH85 empty vector, Δhpn carrying pHpn plasmid, $\Delta hpn-2$ carrying pPH85 empty vector and $\Delta hpn-2$ carrying pHpn-2 plasmid mutants incubated either without nickel (white bars) or with 10 μM NiCl₂ (black bars).

Nickel amounts were measured by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) and expressed in μg of nickel. mg of proteins⁻¹. The data correspond to the mean value of three independent experiments for each strain under each condition with each measurement in triplicate. Errors bars represent the standard deviation. *** indicates that the standard deviation of the mean value is significantly different from that of the wild type strain ($P < 0.01$).



Suppl. Figure S5. Urease activity of *H. pylori* B128 wild type strain, isogenic mutants and complemented strains grown in Brucella β -cyclodextrin medium without added nickel (white bars) or with 10 μ M nickel (black bars).

The identity of each strain is indicated below the bars. Urease activity is expressed as μ mol of urea hydrolyzed. min^{-1} . mg^{-1} of protein. Four independent experiments were performed for each strain under each condition, every point corresponds to the mean value from triplicates. Errors bars represent the standard deviation. *** indicates that the standard deviation of the value is significantly different from that of the wild type strain ($P < 0.01$).



Suppl. Figure S6. Western blots of soluble proteins extracted from cultures of *H. pylori* B128 wild type strain and isogenic mutants in response to nickel supplementation of the medium (0 or 10 μM of NiCl_2).

Targeted protein is UreA. Coomassie-stained gel is shown as loading control. Each lane contains 20 μg proteins.

Suppl. Table S1.

Bacterial strains used in this study

Strains	Relevant characteristics	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
MC1061	<i>F- Δ(ara-leu)7697 [araD139]B/r Δ(codB-lacI)3 galK16 galE15 λ- e14- mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2(r-m+)</i>	[38]
BTH101	<i>F-, cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str^R), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	[39]
<i>Helicobacter pylori</i>		
BI28	Sequenced reference strain	[19]
BI28Δ <i>hpn</i> Cm	Cm ^R	This work
BI28Δ <i>hpn</i> Kn	Km ^R	This work
BI28Δ <i>hpn-2</i>	Km ^R	This work
BI28Δ <i>hpn</i> Δ <i>hpn-2</i>	Cm ^R Km ^R	This work
BI28Δ <i>C_{ter}hpn-2</i>	Km ^R	This work
BI28 + pPH85	Cm ^R	This work
BI28Δ <i>hpn</i> Kn + pPH85	Cm ^R Km ^R	This work
BI28Δ <i>hpn-2</i> + pPH85	Cm ^R Km ^R	This work
BI28Δ <i>hpn</i> + pHpn	Cm ^R Km ^R	This work
BI28Δ <i>hpn-2</i> + pHpn-2	Cm ^R Km ^R	This work

Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>Vectors</i>		
pILL2157	<i>E. coli</i> / <i>H. pylori</i> shuttle IPTG inducible vector carrying <i>lacZ</i> gene, Cm ^R	[43]
pPH85	pILL2157 without <i>lacZ</i> gene, Cm ^R	Y. Redko (unpublished)
pKT25	BACTH vector designed to express a protein fused in frame at its N-terminus with T25 domain of CyaA; p15 ori; Km ^R	[39]
pKNT25	BACTH vector designed to express a protein fused in frame at its C-terminus with T25 domain of CyaA; p15 ori; Km ^R	[39]
pUT18	BACTH vector designed to express a protein fused in frame at its C-terminus with T18 domain of CyaA; ColEI ori; Amp ^R	[39]
pUT18C	BACTH vector designed to express a protein fused in frame at its N-terminus with T18 domain of CyaA; ColEI ori; Amp ^R	[39]
pKT25-Zip	BACTH control plasmid expressing T25-GCN4 leucine zipper	[39]

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pUT18C-Zip	BACTH control plasmid expressing T18-GCN4 leucine zipper	[39]
pKNT25-Zip	BACTH control plasmid expressing GCN4 leucine zipper-T25	[39]
pUT18-Zip	BACTH control plasmid expressing GCN4 leucine zipper-T18	[39]
<i>Plasmids</i>		
pHpn	pPH85 with <i>hpn</i> gene cloned between <i>Nde</i> I and <i>Bam</i> HI	This work
pHpn-2	pPH85 with <i>hpn-2</i> gene cloned between <i>Nde</i> I and <i>Bam</i> HI	This work

Suppl. Table S2.

Primers used in this study

Primer	Position of the primer	Sequence (5'-3')
Construction of the $\Delta hpn::cm$ mutant		
H941	HPI427_Fwd	GAATGAAGTGAGGAAATGGCC
H942	HPI427_Cm_Rev	CGGATCTGTTGAAGGGCGGGATGACTCCTTTGATTAAAAA
H943	HPI427_Cm_Fwd	GCGTAAGGAGGAATAATGTATCGGTGTGGCTAGGGGCAA
H944	HPI427_Rev	CCCCTATAGCCAAGACCGGC
Construction of the $\Delta hpn::km$ mutant		
HI081	HPI427_Fwd	GATTTGAACGATAGCCTAGAC
HI082	HPI427_Km_Rev	GTTAGTCACCCGGGTACGATGACTCCTTTGATTAAAAA
HI083	HPI427_Km_Fwd	TACCTGGAGGGAATAATGTATCGGTGTGGCTAGGGGCAA
HI084	HPI427_Rev	CCCCTATAGCCAAGACCGGC
Construction of the $\Delta hpn-2::km$ mutant		
H949	HPI432_Fwd	GCACAAATGGCTGTCTATCTC
H950	HPI432_Km_Rev	GTTAGTCACCCGGGTACGATGACTCCTTTAATTGAAAT
H951	HPI432_Km_Fwd	TACCTGGAGGGAATAATGTTGGGGCGTTTGTGGGGGCGG
H952	HPI432_Rev	ACCAACGCCCCAAAAGTCAAGGACAAACCC
Construction of the $\Delta Cterhpn-2::km$ mutant		
HI025	HPI432Ct_Fwd	GGATAGCGATCCAACAACCTTA
HI026	HPI432Ct_Km_Rev	GTTAGTCACCCGGGTACTTACGCATTATGGTGATGGTGTTTC
HI027	HPI432Ct_Km_Fwd	CTGGATGAATTGTTTTAGTTGGGGCGTTTGTGGGGGCGG
HI028	HPI432Ct_Rev	GCTTAAGGGAACGCTCTTAG
Cloning of <i>hpn</i> into pPH85		
HI070	Nde_HPI427	GGATACCATATGGCACACCATGAAGAAC
HI071	Bam_HPI427	AGGATCCTTACTCGTGATGCCCCGTGG
Cloning of <i>hpn-2</i> into pPH85		
HI011	Nde_HPI432	ATATAACATATGGCACACCATGAACAACAA
HI005	Bam_HPI432	TTGGATCCTCAATATTGTTGGTTTTGTTG
Constructions for the bacterial two hybrid screen		
Cloning into pUT18 and pNKT25		
UPI-hpn		AAACTGCAGCAGTGAGCTAGAATTTAAATTC
DOI-hpn		AAAGAATTGACTCGTGATGCCCCGTGGCAAC
UPI-hpn2		AAACTGCAGAGCGCTCAAATTGGTGCTCG

Primer	Position of the primer	Sequence (5'-3')
DO1-hpn2		AAAGAATTTCGAAAAGCCAGGAGTAGCCCTAAC
Cloning into pKT25		
UP2-hpn		AAACTGCAGGGATGGCACACCATGAAGAACAAC
DO2-hpn		AAAGAATTCTTACTCGTGATGCCCCGTGGC
UP2-hpn2		AAACTGCAGGGATGGCACACCATGAACAACAAC
DO2-hpn2		AAAGAATTCTAAAAGCCAGGAGTAGCCC
Cloning into pUT18c		
UP3-hpn		AAACTGCAGGATGGCACACCATGAAGAACAAC
DO2-hpn		AAAGAATTCTTACTCGTGATGCCCCGTGGC
UP3-hpn2		AAACTGCAGGATGGCACACCATGAACAACAAC
DO2-hpn2		AAAGAATTCTAAAAGCCAGGAGTAGCCC

Suppl. Table S3.

Values of β -Galactosidase assays

Plasmids	Beta-galactosidase activity	Standard deviation
pUT18/pKT25	47	10
pUT18/pNKT25	42	5
pUT18c/pKT25	48	2
pUT18c/pNKT25	51	5
pUT18/pKT25(Hpn)	38	7
pUT18/pKT25(Hpn2)	52	8
pUT18/pNKT25(Hpn)	427	217
pUT18/pNKT25(Hpn2)	36	7
pUT18c/pKT25(Hpn)	40	4
pUT18c/pKT25(Hpn2)	45	6
pUT18c/pNKT25(Hpn)	70	18
pUT18c/pNKT25(Hpn2)	37	2
pKT25/pUT18(Hpn)	50	8
pKT25/pUT18(Hpn*)	43	3
pKT25/pUT18(Hpn2)	39	2
pKT25/pUT18c(Hpn)	38	2
pKT25/pUT18c(Hpn2)	43	3
pNKT25/pUT18(Hpn)	626	434
pNKT25/pUT18(Hpn*)	54	14
pNKT25/pUT18(Hpn2)	41	2
pNKT25/pUT18c(Hpn)	39	3
pNKT25/pUT18c(Hpn2)	47	7
pUT18(Hpn)/pKT25(Hpn)	3576	383
pUT18(Hpn)/pNKT25(Hpn)	3120	336
pUT18(Hpn)/pKT25(Hpn2)	2623	519
pUT18(Hpn)/pNKT25(Hpn2)	54	11
pUT18(Hpn*)/pKT25(Hpn)	550	54
pUT18(Hpn*)/pNKT25(Hpn)	2021	101
pUT18(Hpn*)/pKT25(Hpn2)	48	5
pUT18(Hpn*)/pNKT25(Hpn2)	46	5
pUT18(Hpn2)/pKT25(Hpn)	42	3
pUT18(Hpn2)/pNKT25(Hpn)	42	4

Plasmids	Beta-galactosidase activity	Standard deviation
pUT18(Hpn2)/pKT25(Hpn2)	39	2
pUT18(Hpn2)/pNKT25(Hpn2)	41	2
pUT18c(Hpn)/pKT25(Hpn)	1124	210
pUT18c(Hpn)/pNKT25(Hpn)	2650	301
pUT18c(Hpn)/pKT25(Hpn2)	521	250
pUT18c(Hpn)/pNKT25(Hpn2)	40	1
pUT18c(Hpn2)/pKT25(Hpn)	61	31
pUT18c(Hpn2)/pNKT25(Hpn)	252	156
pUT18c(Hpn2)/pKT25(Hpn2)	41	8
pUT18c(Hpn2)/pNKT25(Hpn2)	35	2

References

1. Yamaoka Y (2010) Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 7: 629-641.
2. Atherton JC (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease 1: 63-96.
3. Eaton KA, Gilbert JV, Joyce EA, Wanken AE, Thevenot T, et al. (2002) In vivo complementation of ureB restores the ability of *Helicobacter pylori* to colonize. Infect Immun 70: 771-778.
4. Stingl K, De Reuse H (2005) Staying alive overdosed: How does *Helicobacter pylori* control urease activity? International Journal of Medical Microbiology 295: 307-315.
5. Benoit SL, Maier RJ (2008) Hydrogen and nickel metabolism in *Helicobacter* species. Ann N Y Acad Sci 1125: 242-251.
6. Olson JW, Maier RJ (2002) Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. Science 298: 1788-1790.
7. Schauer K (2007) Étude du Métabolisme du Nickel chez *Helicobacter pylori*. Paris: Université Paris 7 – Denis Diderot.
8. Hood MI, Skaar EP (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. Nature Rev Microbiol 10: 525-537.
9. Schauer K, Gouget B, Carriere M, Labigne A, de Reuse H (2007) Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. Molecular Microbiology 63: 1054-1068.
10. Bauerfeind P, Garner RM, Mobley HLT (1996) Allelic exchange mutagenesis of nixA in *Helicobacter pylori* results in reduced nickel transport and urease activity. Infection and Immunity 64: 2877-2880.
11. Olson JW, Mehta NS, Maier RJ (2001) Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 40: 270-270.
12. Stingl K, Schauer K, Ecobichon C, Labigne A, Lenormand P, et al. (2008) In vivo interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. Mol & Cell Proteomics 7: 2429-2441.
13. Witkowska D, Rowińska-Żyrek M, Valensin G, Kozłowski H (2012) Specific poly-histidyl and poly-cysteil protein sites involved in Ni²⁺ homeostasis in *Helicobacter pylori*. Impact of Bi³⁺ ions on Ni²⁺ binding to proteins. Structural and thermodynamic aspects. Coord Chem Rev 256: 133-148.
14. Muller C, Bahlawane C, Aubert S, Delay CM, Schauer K, et al. (2011) Hierarchical regulation of the NikR-mediated nickel response in *Helicobacter pylori*. Nucleic Acids Res 39: 7564-7575.
15. Schauer K, Muller C, Carriere M, Labigne A, Cavazza C, et al. (2010) The *Helicobacter pylori* GroES Cochaperonin HspA Functions as a Specialized Nickel Chaperone and Sequestration Protein through Its Unique C-Terminal Extension. J Bacteriol 192: 1231-1237.
16. Eppinger M, Baar C, Linz B, Raddatz G, Lanz C, et al. (2006) Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. PLoS Genet: e120.
17. Cun SJ, Li HY, Ge RG, Lin MCM, Sun HZ (2008) A histidine-rich and cysteine-rich metal-binding domain at the C terminus of heat shock protein A from *Helicobacter pylori* - Implication for nickel homeostasis and bismuth susceptibility. Journal of Biological Chemistry 283: 15142-15151.
18. Farnbacher M, Jahns T, Willrodt D, Daniel R, Haas R, et al. (2010) Sequencing, annotation, and comparative genome analysis of the gerbil-adapted *Helicobacter pylori* strain B8. BMC Genomics 11: 335.
19. McClain M, Shaffer C, Israel D, Peek RJ, Cover T (2009) Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. BMC Genomics 10: 3.

20. Gilbert JV, Ramakrishna J, Sunderman FW, Wright A, Plaut AG (1995) Protein Hpn: cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*. *Infection and Immunity* 63: 2682-2688.
21. Tomb J-F, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, et al. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547.
22. Ge RG, Watt RM, Sun XS, Tanner JA, He QY, et al. (2006) Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn: potential for Ni²⁺ storage in *Helicobacter pylori*. *Biochemical Journal* 393: 285-293.
23. Rowinska-Zyrek M, Witkowska D, Bielinska S, Kamysz W, Kozlowski H (2011) The -Cys-Cys- motif in *Helicobacter pylori*'s Hpn and HspA proteins is an essential anchoring site for metal ions. *Dalton Trans* 40: 5604-5610.
24. Zeng YB, Zhang DM, Li HY, Sun HZ (2008) Binding of Ni²⁺ to a histidine- and glutamine-rich protein, Hpn-like. *J Biol Inorg Chem* 13: 1121-1131.
25. Zeng Y, Yang N, Sun H (2011) Metal-binding properties of an Hpn-like histidine-rich protein. *Chem Eur J* 17: 5852-5860.
26. Witkowska D, Bielinska S, Kamysz W, Kozlowski H (2011) Cu²⁺ and Ni²⁺ interactions with N-terminal fragments of Hpn and Hpn-like proteins from *Helicobacter pylori*: unusual impact of poly-Gln sequence on the complex stability. *J Inorg Biochem*
27. Ge RG, Zhang Y, Sun XS, Watt RM, He QY, et al. (2006) Thermodynamic and kinetic aspects of metal binding to the histidine-rich protein, Hpn. *J Am Chem Soc* 128: 11330-11331.
28. Mobley HLT, Garner RM, Chippendale GR, Gilbert JV, Kane AV, et al. (1999) Role of Hpn and NixA of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to bismuth and other metal ions. *Helicobacter* 4: 162-169.
29. Seshadri S, Benoit SL, Maier RJ (2007) Roles of His-rich hpn and hpn-like proteins in *Helicobacter pylori* nickel physiology. *Journal of Bacteriology* 189: 4120-4126.
30. Harper CG, Feng Y, Xu S,aylor N, Kinsel M, et al. (2002) *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J Clin Microbiol* 40: 4536-4543.
31. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci* 95: 5752-5756.
32. Suerbaum S, Josenhans C (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Rev Microbiol* 5: 441-452.
33. Ge R, Sun X, Wang D, Zhou Q, Sun H (2011) Histidine-rich protein Hpn from *Helicobacter pylori* forms amyloid-like fibrils in vitro and inhibits the proliferation of gastric epithelial AGS cells. *Biochim Biophys Acta* 1813.
34. Ge R, Sun X (2011) The in vivo functions of a histidine-rich protein Hpn in *Helicobacter pylori*: linking gastric and Alzheimer's diseases together? *Med Hypotheses* 77: 788-790.
35. Zavos C, Kountouras J, Deretzi G, Tsona A, Polyzos S, et al. (2012) Hpn protein as a mediator between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in sub-populations worldwide. *Med Hypotheses* 78: 349-350.
36. Stahler FN, Odenbreit S, Haas R, Wilrich J, Van Vliet AH, et al. (2006) The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. *Infect Immun* 74: 3845-3852.
37. Ranquet C, Ollagnier-de-Choudens S, Loiseau L, Barras F, Fontecave M (2007) Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins. *J Biol Chem* 282: 30442-30451.
38. Casadaban M, Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusions and cloning in *E. coli*. *J Mol Biol* 138: 179-207.
39. Karimova G, Ullmann A, Ladant D (2001) Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 73-82.
40. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
41. Skouloubris S, Thiberge JM, Labigne A, De Reuse H (1998) The *Helicobacter pylori* Urel protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infect Immun* 66: 4517-4521.
42. Bury-Moné S, Skouloubris S, Dauga C, Thiberge J-M, Dailidienė D, et al. (2003) Presence of active aliphatic amidases in *Helicobacter* species able to colonize the stomach. *Infect Immun* 71: 5613-5622.

43. Boneca IG, Ecobichon C, Chaput C, Mathieu A, Guadagnini S, et al. (2008) Development of inducible systems to engineer conditional mutants of essential genes of *Helicobacter pylori*. Appl Environ Microbiol 74: 2095-2102.
44. Backert S, Kwok T, König W (2005) Conjugative plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori* mediated by chromosomally encoded relaxase and TraG-like proteins. Microbiology 151: 3493-3503.
45. Leduc D, Gallaud J, Stingl K, De Reuse H (2010) Coupled amino acid deamidase-transport systems essential for *Helicobacter pylori* colonization. Infect & Immun 78: 2782-2792.
46. Contreras M, Thiberge JM, Mandrand-Berthelot MA, Labigne A (2003) Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. Molecular Microbiology 49: 947-963.
47. Altschul S, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389-3402.
48. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res 30: 3059-3066.
49. Philippe H (1993) MUST, a computer package of Management Utilities for Sequences and Trees. Nucleic Acids Res 21: 5264-5272.
50. Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, et al. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol 59: 307-321.

Chapitre 2. Systèmes couplés de déamidation et de transport de l'asparagine et de la glutamine, essentiels à la colonisation par *H. pylori*

I. Eléments de contexte et problématique

H. pylori possède un seul transporteur de sucres et consomme préférentiellement les acides aminés lors de sa croissance comme sources d'énergie et de carbone. Parmi les acides aminés les plus consommés par *H. pylori*, l'aspartate et le glutamate, ainsi que l'asparagine et la glutamine, sont majoritaires (Mendz & Hazell, 1995). Cependant, aucune étude n'a rapporté d'auxotrophie de *H. pylori* pour ces acides aminés (Reynolds & Penn, 1994). Par ailleurs, il a été démontré que les souches de *H. pylori* possèdent d'intenses activités glutaminase et asparaginase menant au relargage d'ammoniac dans le milieu (Stark *et al*, 1997). Les mécanismes de cette production d'ammoniac restaient à élucider.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux amidohydrolases qui pourraient être responsables des activités détectées : la γ -Glutamyl transpeptidase (γ GT), et l'asparaginase (AnsB).

Une première étude a démontré que l'enzyme γ -Glutamyl transpeptidase était responsable de l'hydrolyse de la glutamine et du glutathion chez *H. pylori* (Chevalier *et al*, 1999a; Shibayama

et al, 2007). Cette enzyme a aussi un effet pro-apoptotique sur les cellules gastriques en culture et est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire *via* l'activation de la cyclo-oxygénase 2 (Shibayama *et al*, 2003; Atherton, 2006). Quant à l'activité asparaginase, au démarrage de cette étude, un article faisait mention de la protéine codée par *hp0723* et douée d'activités asparaginase et glutaminase *in vitro*. De plus, cette enzyme purifiée présentait une cytotoxicité sur des cellules gastriques en culture (Cappelletti *et al*, 2008).

L'hydrolyse de l'asparagine et de la glutamine par ces deux enzymes s'accompagne d'un relargage d'ammoniac. Tout d'abord, nous avons cherché à déterminer la localisation, le rôle et la régulation de l'activité de ces enzymes *in vivo* ainsi qu'un éventuel rôle de l'ammoniac produit par ces enzymes dans la protection contre l'acidité. Ensuite, nous nous sommes intéressés au devenir du glutamate et de l'aspartate produits à partir de la glutamine et de l'asparagine chez *H. pylori*.

Une étude a démontré que les souches de *Campylobacter jejuni* qui possèdent des protéines homologues aux enzymes γ GT et AnsB ont un avantage sélectif pour la colonisation de certains organes dans un modèle animal comparativement aux souches qui ne possèdent pas ces homologues (Hofreuter *et al*, 2008). Chez *H. pylori*, ces deux enzymes sont nécessaires à la colonisation du modèle animal (Chevalier *et al*, 1999a; Merrell *et al*, 2003). Il a été montré que l'acquisition des acides aminés peut être impliquée dans la virulence bactérienne et dans la résistance aux stress rencontrés dans l'hôte (Gobert *et al*, 2001; Foster, 2004; Wood, 2007). Les données obtenues chez *C. jejuni* suggèrent que la capacité d'un organisme à consommer une grande diversité d'acides aminés apporte un avantage sélectif pour la colonisation de niches diverses.

Sachant que *H. pylori* est une bactérie qui vit préférentiellement dans le mucus, près des cellules gastriques, dans un environnement proche de la neutralité, nous avons émis l'hypothèse que la production d'ammoniac dans le mucus, conjointement au pouvoir cytotoxique de ces enzymes et de la déplétion locale en acides aminés, pourraient participer à la pathogenèse de l'infection.

2. Résumé des résultats

2.1. Spécificité de substrat et localisation cellulaire de AnsB

Nous avons premièrement caractérisé la spécificité de substrat *in vivo* des enzymes γ GT et AnsB. Nous avons montré que la γ GT hydrolyse uniquement la glutamine et non l'asparagine,

avec production d'ammoniac. Nous avons aussi montré que la γ GT est la seule enzyme de *H. pylori* capable d'hydrolyser la glutamine avec production d'ammoniac *in vivo*.

D'autre part, *In vivo*, AnsB hydrolyse uniquement l'asparagine et est seule responsable de l'activité asparaginase et de la production d'ammoniac associée.

Le fait que la γ GT soit une enzyme sécrétée avait déjà été démontré (Chevalier *et al*, 1999a). En revanche, la question de la localisation de AnsB était ouverte. Nous avons remarqué une erreur d'annotation dans le génome de la souche 26695 et identifié un démarrage de transcription alternatif pour le gène *ansB*. Ce démarrage de transcription alternatif prédit une protéine possédant un peptide signal. Nous avons ensuite démontré expérimentalement que AnsB était une enzyme périplasmique (Voir Figure 3B de l'article).

2.2. Transport du glutamate et de l'aspartate

Nous avons ensuite investigué le devenir du glutamate et de l'aspartate provenant de l'hydrolyse de la glutamine et de l'asparagine, respectivement. Chez *H. pylori*, le transport du glutamate et de l'aspartate est dépendant du sodium. Une étude avait de plus démontré que le transport du glutamate était dépendant de l'activité de la γ GT (Shibayama *et al*, 2007).

Sur la base de l'annotation du génome de *H. pylori*, nous avons identifié et caractérisé le transporteur DcuA, responsable de l'importation de l'aspartate uniquement. Nous avons ensuite démontré que le transporteur GltS était responsable de l'importation du glutamate uniquement. Nous avons parallèlement démontré que le transport de l'aspartate par DcuA et du glutamate par GltS, étaient dépendants de l'activité de AnsB et de γ GT respectivement. Par voie de fait, nous avons démontré que l'hydrolyse de l'asparagine et de la glutamine était couplée à l'importation de l'aspartate et du glutamate dans la bactérie (Voir Figures 2 et 3 de l'article).

2.3. Modulation fonctionnelle et transcriptionnelle des couples enzymes / transporteur γ GT/GltS et AnsB/DcuA en fonction du pH

Nous avons cherché à caractériser le comportement des couples enzymes/transporteurs en fonction du pH. Nous avons montré que l'activité de ces couples était optimale à pH neutre, ce qui permet d'exclure un rôle dans la résistance à l'acidité par l'ammoniac produit par γ GT et AnsB.

Pour appuyer notre raisonnement, nous avons réalisé des expériences de qRT-PCR sur les ARN des souches cultivées à pH 7 ou à pH 5. Nous avons montré que le gène codant pour la

γ GT est très légèrement induit par l'acidité tandis que les autres gènes (*ansB*, *dcuA*, *gltS*) sont très légèrement réprimés par l'acidité. Ces résultats excluent donc un rôle majeur de ces couples dans la réponse à l'acidité de *H. pylori*.

Nous avons montré que ces systèmes fonctionnent de manière optimale à pH neutre, correspondant au pH du mucus au contact des cellules gastriques (Figures 2, 3 et 5 de l'article).

2.4. Caractère essentiel des systèmes couplés d'hydrolyse et de transport de l'asparagine et de la glutamine

Il avait déjà été montré que AnsB et γ GT étaient impliqués dans la colonisation du modèle animal (Chevalier *et al*, 1999a; Merrell *et al*, 2003). Le transporteur GltS a été montré comme étant un facteur de colonisation essentiel chez le modèle de colonisation gerbille (Kavermann *et al*, 2003). Nous avons donc testé la capacité d'une souche mutant de *dcuA* à coloniser la souris et montré que ce transporteur était essentiel à la colonisation. En conséquence, tous les partenaires des couples AnsB/DcuA et γ GT/GltS sont essentiels à la colonisation du modèle animal (Figure 4 de l'article).

3. Discussion

Nous avons démontré dans cette étude qu'il existait chez *H. pylori* deux systèmes couplés d'hydrolyse périplasmique de la glutamine et de l'asparagine, associés à l'importation du glutamate et de l'aspartate au travers de transporteurs spécifiques.

Ces deux systèmes possèdent une activité optimale à pH neutre, qui va conduire à la production d'ammoniac dans le périplasme, au contact des cellules épithéliales, conjointement à la déplétion en glutamine, glutamate, asparagine et aspartate dans le mucus. De plus, leur régulation transcriptionnelle n'est pas dépendante de l'acidité, comme c'est le cas pour l'opéron de l'uréase. Ces deux systèmes ne sont donc probablement pas dévolus à la protection contre l'acidité.

Il est intéressant de noter que la glutamine et l'asparagine font partie des acides aminés les plus consommés par *H. pylori*. Cependant, notre étude démontre qu'ils ne peuvent pas être importés directement et qu'ils doivent d'abord être déamidés dans le périplasme. On peut donc supposer que les quantités d'ammoniac synthétisées à pH 7, au plus près des cellules épithéliales, sont conséquentes.

Les activités des transporteurs DcuA et GltS, et des enzymes AnsB et γ GT, s'accompagnent d'une déplétion locale en glutamate, glutamine, aspartate et asparagine. *H. pylori* ne présente pas d'auxotrophie pour ces acides aminés (Testerman *et al*, 2006). De plus, chez *H. pylori*, les $^{Gln}ARNt$ et $^{Asn}ARNt$ sont synthétisés en deux étapes. Premièrement les acides aminés $^{Gln}ARNt$ et $^{Asn}ARNt$ sont chargés par du glutamate et de l'aspartate, respectivement. Deuxièmement, le complexe de transamidation GatCAB, en se servant de la glutamine comme donneur, permet la fixation d'une molécule d'ammoniac sur les $^{Gln}ARNt^{Glu}$ et $^{Asn}ARNt^{Asp}$ pour former les ARNt correctement chargés. On peut en conclure qu'il n'y a pas de nécessité évidente pour *H. pylori* d'importer l'asparagine et la glutamine

Il n'a pas été rapporté de besoins particuliers en glutamate et aspartate dans le périplasme de *H. pylori*. La glutamine est un composé central dans la physiologie bactérienne. Comme nous l'avons montré, chez *H. pylori*, la glutamine n'est pas importée. *H. pylori* forme donc intracellulairement de la glutamine à partir de la glutamine synthétase, une enzyme essentielle.

Il a été montré que l'ammoniac exerçait un effet pro-oncogène sur l'estomac du rat (Tsujii *et al*, 1993). De nombreuses études ont démontré le rôle protecteur de la glutamine contre l'apoptose et le stress oxydatif en général, ainsi que son rôle protecteur sur les cellules gastriques soumises à l'action de l'ammoniac (Nakamura & Hagen, 2002; Ban & Kozar, 2010; Kallweit *et al*, 2012). De plus, une activité élevée de la γ GT de *H. pylori* est plus souvent retrouvée dans les souches de patients présentant un ulcère (Gong *et al*, 2010).

Nous avons donc proposé un modèle où la déplétion locale en acide aminés protecteurs est associée à une production d'ammoniac délétère au plus près des cellules épithéliales dans un nouveau mécanisme de pathogenèse. Des travaux récents ont confirmé notre hypothèse en prouvant que la déplétion en glutamine est responsable de l'effet antiprolifératif de la γ GT de *H. pylori* sur les lymphocytes T (Wüstner *et al*, 2012).

4. Article

Article publié dans *Infection and Immunity* le 5 avril 2010 dans la rubrique *Bacterial Infections*. Infect Immun. 2010 Jun;78(6):2782-92.

Coupled amino acid deamidase-transport systems essential for *Helicobacter pylori* colonization

Leduc Damien, Gallaud Julien, Stingl Kerstin, de Reuse Hilde

INFECTION AND IMMUNITY, June 2010, p. 2782–2792
0019-9567/10/\$12.00 doi:10.1128/IAI.00149-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 78, No. 6

Coupled Amino Acid Deamidase-Transport Systems Essential for *Helicobacter pylori* Colonization^{∇†}

Damien Leduc, Julien Gallaud, Kerstin Stingl, and Hilde de Reuse*

Institut Pasteur, Unité Pathogénèse de *Helicobacter*, Département de Microbiologie, 75724 Paris cedex 15, France

Received 12 February 2010/Returned for modification 19 March 2010/Accepted 31 March 2010

In addition to their classical roles as carbon or nitrogen sources, amino acids can be used for bacterial virulence, colonization, or stress resistance. We found that original deamidase-transport systems impact colonization by *Helicobacter pylori*, a human pathogen associated with gastric pathologies, including adenocarcinoma. We demonstrated that L-asparaginase (Hp-AnsB) and γ -glutamyltranspeptidase (Hp- γ GT) are highly active periplasmic deamidases in *H. pylori*, producing ammonia and aspartate or glutamate from asparagine and glutamine, respectively. Hp-GltS was identified as a sole and specialized transporter for glutamate, while aspartate was exclusively imported by Hp-DcuA. Uptake of Gln and Asn strictly relies on indirect pathways following prior periplasmic deamidation into Glu and Asp. Hence, in *H. pylori*, the coupled action of periplasmic deamidases with their respective transporters enables the acquisition of Glu and Asp from Gln and Asn, respectively. These systems were active at neutral rather than acidic pH, suggesting their function near the host epithelial cells. We showed that Hp-DcuA, the fourth component of these novel deamidase-transport systems, was as crucial as Hp- γ GT, Hp-AnsB, and Hp-GltS for animal model colonization. In conclusion, the pH-regulated coupled amino acid deamidase-uptake system represents an original optimized system that is essential for *in vivo* colonization of the stomach environment by *H. pylori*. We propose a model in which these two nonredundant systems participate in *H. pylori* virulence by depleting gastric or immune cells from protective amino acids such as Gln and producing toxic ammonia close to the host cells.

In microorganisms, amino acids are generally taken up for protein synthesis or as a source of energy and/or nitrogen. In addition, amino acids can be used for other functions important for bacterial virulence, colonization, or stress resistance. Some examples are amino acid decarboxylases required for acid resistance (18), proline and glycine-betaine uptake required for osmoprotection (59), and arginase required for depletion of arginine from the macrophages to limit the nitric oxide-dependent immune response (20). In the present study, we found two distinct deamidase-transport systems, linking amino acid metabolism and the ability to colonize in *Helicobacter pylori*. *H. pylori* is a bacterial pathogen that colonizes the stomach of half of the human population in the world (4). Persistent colonization by *H. pylori* is associated with the development of gastric pathologies, including peptic ulcer disease and adenocarcinoma (4). *H. pylori* preferentially uses amino acids as a sole energy source and consumes large amounts of aspartate (Asp), glutamate (Glu), and their respective amides (Asn and Gln) (33, 52). In *H. pylori*, strong asparaginase and glutaminase activities have been reported that produce ammonia (NH₃) from hydrolysis of Asn and Gln, respectively (52). The role of these activities in the nutrition or survival of *H. pylori* in the human host remained elusive. The major NH₃ producer of *H. pylori* is a potent urease that hydrolyzes urea whose availability is regulated by UreI, a dedicated acid-gated

urea channel (50, 57). Production of NH₃, a buffering compound, by the cytoplasmic urease is essential for successful colonization of *H. pylori*, since it allows this bacterium to resist gastric acidity. It is generally admitted that a pH gradient exists in the stomach ranging from median pH 2 in the lumen to pH 4.5 in the gastric mucus layer and to a pH close to neutrality near to the epithelial cells where about 20% of total bacteria adhere (1, 46). The absolute pH value at the epithelial cell surface has been questioned by a couple of groups (5, 14) who, using pH-sensitive dyes, have found it to be close to pH 4. However, this controversial result raises a major concern for how epithelial cells may resist at such a low pH.

Recent work showed that the extracellular Gln hydrolysis activity of *H. pylori* is provided by the secreted and apoptosis-inducing γ -glutamyltranspeptidase (Hp- γ GT; EC 2.3.2.2), HP1118 in strain 26695 (6, 48). Hp- γ GT is essential (13) or at least provides some advantages to *H. pylori* for mouse colonization (32). Purified Hp- γ GT disturbed the proliferation of gastric cells by upregulating growth factors (10), inducing mitochondria-mediated apoptosis (29), and inhibiting T-cell proliferation (45). In *H. pylori*, both Glu and Gln transport were shown to depend on sodium ions, and the latter additionally on Hp- γ GT activity (48, 49).

The purified recombinant product of *hp0723* (that we designated Hp-AnsB) was shown to hydrolyze *in vitro* Asn, as well as Gln to a lower extent, and to exert cytotoxic activities on cell lines (11). In addition, a Δ *hp0723* mutant of *H. pylori* was shown to be defective for *in vivo* competition in the gerbil model (34). Although consumption of Asp, Asn, Glu, and Gln in *H. pylori* has been previously reported, *H. pylori* transporters for these amino acids remained unidentified. Moreover, little was known about urease-independent NH₃ production in *H.*

* Corresponding author. Mailing address: Institut Pasteur, Département de Microbiologie, Unité Pathogénèse de *Helicobacter*, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris cedex 15, France. Phone: 33-1-4061-3641. Fax: 33-1-4061-3640. E-mail: hde reuse@pasteur.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://iai.asm.org/>.

[∇] Published ahead of print on 5 April 2010.

Vol. 78, 2010

ESSENTIAL AMINO ACID DEAMIDASE-UP TAKE IN *H. PYLORI* 2783

TABLE 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Relevant characteristic	Reference
<i>E. coli</i>		
MC1061	Used for plasmid constructions	12
<i>H. pylori</i>		
26695	Sequenced reference strain	56
26695 Δ ansB	HP0723::Km ^r	This work
26695 Δ dcaA	HP0724::Km ^r	This work
26695 Δ ggt	HP1118::Km ^r	This work
26695 Δ gltS	HP1506::Km ^r	This work
26695 Δ ansB Δ ggt	HP0723::Km ^r HP1118::Km ^r	This work
SS1	Mouse-adapted strain	30
SS1 Δ dcaA	HP0724::Km ^r	This work

pylori, the mechanisms associated to glutaminase and asparaginase activities, their localization, regulation, and function *in vivo*.

In the present study, we have identified two nonredundant systems involved in amino acid uptake coupled with NH₃ production. Two sole genes responsible for Asp and Glu uptake activities in *H. pylori* were identified. We demonstrated that the Asp transporter is essential to colonize the gastric mucosa of mice infected with *H. pylori*. Asparaginase activity was periplasmic and hydrolyzed Asn *in vivo* but not Gln. We demonstrated that the coupled deamidase-uptake activities are the exclusive systems responsible for direct (Asp and Glu) and indirect (Asn and Gln) amino acids assimilation by *H. pylori*. Moreover, these activities are functional at pH values corresponding to those found close to the epithelial cells of the host.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Plasmids employed to transform *H. pylori* were constructed using *Escherichia coli* strain MC1061 (12) (Table 1) grown at 37°C on solid or in liquid Luria-Bertani medium (35). Spectinomycin was used at 100 μ g \cdot ml⁻¹ for the selection of *E. coli* transformants. The *H. pylori* strains used in this study were strains 26695 (56) and SS1 (30). *H. pylori* strains were grown on blood agar base 2 (Oxoid) plates supplemented with 10% defibrinated horse blood and with an antibiotics-fungicide mix consisting of vancomycin (final concentration, 12.5 μ g \cdot ml⁻¹), polymyxin B (0.31 μ g \cdot ml⁻¹), amphotericin B (2.5 μ g \cdot ml⁻¹), and trimethoprim (6.25 μ g \cdot ml⁻¹). *H. pylori* was incubated at 37°C under microaerobic conditions (6% O₂, 10% CO₂, and 84% N₂). For selection of *H. pylori* transformants, kanamycin and chloramphenicol were added to the growth medium at concentrations of 20 μ g \cdot ml⁻¹ and 4 μ g \cdot ml⁻¹, respectively. The different *H. pylori* mutants were obtained by natural transformation, as described previously (13), with 2 μ g of plasmid DNA. Liquid cultures were grown in brain heart infusion (BHI) (Oxoid) supplemented with 4% decomplexed fetal calf serum (Eurobio) or with 0.2% β -cyclodextrin (used for quantitative real-time reverse transcriptase PCR [qRT-PCR]; Sigma) and the antibiotics-fungicide mix.

Molecular techniques. Standard procedures were used for endonuclease digestions, ligation, agarose gel electrophoresis, and elution of DNA fragments from agarose gels (44). Qiagen midi- or maxicolumns and a QIAamp DNA extraction kit (Qiagen) were used for large-scale plasmid and rapid chromosomal DNA preparations, respectively. PCR was carried out according to the manufacturer's recommendations using either the *Taq* DNA polymerase kit (Amersham) or the Phusion Hot Start high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes). The pCR8/GW/TOPO TA cloning kit (Invitrogen) was used for the construction of suicide plasmids.

Construction of *H. pylori* mutants. Chromosomal inactivation of *hp0723* (encoding Hp-AnsB), *hp0724* (encoding Hp-DcaA), *hp1118* (encoding Hp- γ GT), and *hp1506* (encoding Hp-GltS) genes was performed in *H. pylori* strain 26695 or SS1. Deletions were introduced by allelic exchange using plasmids (derived from the pCR8/GW/TOPO TA vector) in which around 500 bp of the 5'-end and the 3'-end regions flanking the open reading frame of the target gene and an

antibiotic resistance cassette (nonpolar kanamycin cassette [50] or nonpolar chloramphenicol cassette) were cloned. These plasmids were constructed and amplified in *E. coli* and used as suicide plasmids in *H. pylori*. *H. pylori* mutants were obtained by natural transformation with these suicide plasmids as previously described (7). The double mutants were constructed in two steps, as follows: a first inactivation was carried out with the nonpolar kanamycin cassette, and the second one with the nonpolar chloramphenicol cassette. Correct chromosomal insertion of the nonpolar kanamycin or chloramphenicol cassettes and correct allelic exchange were verified by PCR.

Measurement of asparaginase and glutaminase activity levels. The glutaminase and asparaginase activity levels of *H. pylori* were measured using the ammonia assay kit (Sigma) with culture supernatants standardized as follows. *H. pylori* strains were amplified on plates for 24 h, grown overnight in liquid medium, inoculated in liquid culture at an optical density of 600 nm (OD₆₀₀) of 0.2, and left to grow for 5 h until an OD₆₀₀ of 0.5. These fresh log-phase cells were harvested and washed once in phosphate-buffered saline (PBS; Roche), and 3 \times 10⁸ CFU of bacteria (corresponding to 0.135 mg dry mass of bacterial cells) were resuspended in 1 ml of buffer with 5 mM Gln or Asn. Buffers used were either PBS at pH 7 or citrate-phosphate buffer (citric acid, 0.1 M; Na₂HPO₄, 0.2 M) for pH 7, 6.5, 6, 5.5, 5, or 4.5 in order to avoid changes in pH during the pH range experiments. Aliquots were taken after 15, 30, or 90 min of incubation at 37°C and centrifuged to pellet the bacteria. The NH₃ concentration of the supernatant was measured immediately with the ammonia assay kit (Sigma), according to the manufacturer's recommendations. This assay is based on the following reaction: in the presence of NH₃, α -ketoglutaric acid, and NADPH, the enzyme glutamate dehydrogenase produces Glu and NADP⁺. The oxidation of NADPH to NADP⁺ results in a decrease in the absorbance at 340 nm that is proportional to the concentration of NH₃. The samples were diluted when necessary in order to measure NH₃ amounts in the region of linearity of the assay, according to the manufacturer's recommendations, and the NH₃ production was calculated from a standard curve.

Measurement of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate uptake by *H. pylori*. The procedure is adapted from that used by Shibayama et al. (49). *H. pylori* parental strains and the isogenic knockout single or double mutants were grown under the same standardized conditions as those used for the enzymatic assays described above. Bacterial cells (0.27 mg dry mass of bacterial cells) were collected by centrifugation and washed twice with 5 mM morpholineethanesulfonic acid (MES) buffer, pH 6.6, with 150 mM NaCl. Uptake was initiated in the same buffer by adding 10 μ l of [¹⁴C]-labeled glutamine (L-[U-¹⁴C]glutamine; specific activity, 9.47 GBq/mmol) (196 μ M; Amersham Bioscience), 10 μ l of [¹⁴C]-labeled glutamate (L-[U-¹⁴C]glutamate; specific activity, 9.36 GBq/mmol) (198 μ M; Amersham Bioscience), 3 μ l of [¹⁴C]-labeled asparagine (L-[U-¹⁴C]asparagine; specific activity, 5.55 GBq/mmol) (666 μ M; American Radiolabeled Chemicals), or 8.3 μ l of [¹⁴C]-labeled aspartate (L-[U-¹⁴C]aspartate; specific activity, 7.66 GBq/mmol) (241 μ M; Amersham Bioscience) to the bacterial suspension. Final concentrations were 1.96 μ M glutamine, 1.98 μ M glutamate, 2.00 μ M asparagine, or 2.00 μ M aspartate. Aliquots of the samples were taken after various incubation times at 37°C and immediately filtrated on Durapore 0.45- μ m membrane filters (Millipore) that were abundantly washed with 10 ml of the washing buffer that contained cold glutamine, glutamate, glutamine, or aspartate at 0.2 mM (depending on the [¹⁴C]-labeled amino acid tested). Washing avoids unspecific binding of the radiolabeled amino acids to the bacteria. Finally, filters were transferred into scintillation vials with scintillation liquid (EcoLite+; MP Biomedicals). Radioactivity of bacteria retained on the filters was quantified by liquid scintillation counting between 5 and 150 keV.

Mouse model of colonization. Aliquots of 100 μ l containing 1.6 \times 10⁸ *H. pylori* SS1 parental strain or of 100 μ l containing 1.1 \times 10⁸ SS1 Δ dcaA mutant in peptone broth were inoculated orogastrically into eight NMRI-specific pathogen-free mice each (Charles River Laboratories), as previously described (17). One month after inoculation, the mice were killed, and stomachs were removed for assessment of colonization by *H. pylori*. Viable *H. pylori* in the stomachs of these mice were enumerated by quantitative culturing of serial dilutions of the homogenized tissues in peptone broth and plating on blood agar plates supplemented with bacitracin (200 μ g \cdot ml⁻¹) and nalidixic acid (10 μ g \cdot ml⁻¹).

Quantitative real-time PCR. An overnight culture of *H. pylori* 26695 was harvested by centrifugation at 4°C for 10 min at 3,000 \times g and resuspended in liquid BHI supplemented with 0.2% β -cyclodextrin and the antibiotics-fungicide mix, which was adjusted at pH 7 or pH 5 by HCl addition. Total RNAs were extracted from exponential-phase *H. pylori* liquid cultures (optical density at 600 nm = 0.5). RNA was extracted using the phenol-chloroform method as previously described (8). DNA was removed from RNA preparations by DNase I digestion with 5 U RNase-free DNase I recombinant (Roche) for 20 min at 37°C followed, by a second phenol-chloroform purification. A second DNase treat-

TABLE 2. Distribution of the *ureA*, *ureB*, *ureI*, *ggt*, *gltS*, *dcuA*, and *ans* genes in *Helicobacter* species for which complete genome sequences are available

<i>Helicobacter</i> strain	Host	Presence (+) or absence (–) of indicated gene							
		<i>ureA</i>	<i>ureB</i>	<i>ureI</i>	<i>ggt</i>	<i>gltS</i>	<i>dcuA</i>	<i>ans</i> (SP) ^a	<i>ans</i> (no SP) ^a
Gastric									
<i>H. pylori</i> 26695	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> 98-10	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> B128	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> G27	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> HPAG1	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> HPKX_438_AG0C1	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> HPKX_438_CA4C1	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> J99	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> P12	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. pylori</i> Shi470	Human	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. acinonychis</i> Sheeba	Wildcat	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. mustelae</i> ATCC 43772	Ferret	+	+	+	+	+	–	–	+
Enterohepatic									
<i>H. canadensis</i> MIT 98-5491	Human	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>H. cinaedi</i> CCUG 18818	Hamster	–	–	–	–	–	+	–	+
<i>H. pullorum</i> MIT 98-5489	Bird	–	–	–	–	+	+	+	–
<i>H. winthamensis</i> ATCC BAA-430	Human	–	–	–	–	+	+	+	–
<i>H. bilis</i> ATCC 43879	Human, mouse, and dog	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>H. hepaticus</i> ATCC 51449	Mouse	+	+	+	–	–	+	+	–

^a *ans*, gene encoding asparaginase. No assignment to either *ansA* or *ansB* genes encoding closely related asparaginases was done, since our phylogenetic analysis (see tree shown in Fig. S4 in the supplemental material) revealed several inconsistencies with the previous annotations. SP, a signal peptide was detected on the sequence (SignalP 3.0 hidden Markov model [HMM] score ≥ 0.750); no SP, a signal peptide was not detected (SignalP 3.0 HMM score < 0.750).

ment was carried out with the Turbo DNA-free kit (Ambion), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified on a NanoDrop spectrophotometer and visualized on an ethidium bromide-stained agarose gel.

Total RNA served as a template for cDNA synthesis using the AMV reverse transcriptase (Promega). Synthesis reactions were carried out by following the manufacturer's protocol, starting with using 1 μ g total RNA and 50 ng random hexamers (Roche) per 20- μ l reaction mixture. cDNA was diluted to 100 ng/ μ l. RNA transcripts were quantified on an Applied Biosystems StepOnePlus PCR machine using Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) in a 20- μ l reaction mixture containing 50 ng of total cDNA. For each experiment, the transcript level was normalized to the level of the *ppk* gene (polyphosphate kinase; *hp1010*). Table S1 in the supplemental material lists the primer sequences used for qRT-PCR.

Bioinformatic analysis and signal peptide detection. Signal peptide detection was performed with the SignalP 3.0 interface (16). For the study of the distribution of the *ureA*, *ureB*, *ureI*, *ggt*, *gltS*, *ansB*, and *dcuA* genes in the *Helicobacter* genus presented in Table 2, we used manual tBLASTn analyses with the genomic BLAST tool available on the NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) and with the dedicated BLAST server for *Helicobacter mustelae* analysis (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/h_mustelae). The sequence alignment shown in Fig. S2 in the supplemental material was performed using ClustalW with default settings (55), followed by manual modifications of the asparaginase sequences obtained from the NCBI nucleotide database, with the exception of the sequence of *H. mustelae* asparaginase, obtained from the Sanger website (http://www.sanger.ac.uk/Projects/H_mustelae/).

RESULTS

***H. pylori* asparaginase activity is provided by Hp-AnsB.** To identify the enzyme responsible for the *H. pylori* asparaginase activity, we measured Asn deamidation activities in the *H. pylori* 26695 strain and different mutants. The *ansB* *hp0723* gene is annotated as coding for type II L-asparaginase. We constructed a deletion mutant of this gene in the *H. pylori* 26695 strain. In addition, a deletion mutant of the gene encoding Hp- γ GT (*hp1118*) and a double mutant *Δ ansB Δ ggt* strain (Table 1) were constructed. Growth in liquid medium of

these mutants was unchanged compared with that of the wild-type strain (data not shown). The asparaginase activity level was measured in whole bacteria by detection of NH_3 production in the presence of Asn. No detectable spontaneous hydrolysis (SH) of Asn was detected during the assay. Figure 1A shows the NH_3 production resulting from *H. pylori* asparaginase activity, which corresponds to 1.2 μ mol per mg of bacterial cells after 15 min of incubation using 5 mM Asn as a substrate. The same level of asparaginase activity was measured with the *Δ ggt* mutant, indicating that Hp- γ GT does not display asparaginase activity. An important decrease in asparaginase activity of more than 90% was observed with the *Δ ansB* mutant. The same decreased activity was measured with the *Δ ansB Δ ggt* double mutant. These data demonstrate that Hp-AnsB is responsible for all the asparaginase activity in *H. pylori*.

***H. pylori* glutaminase activity is provided by Hp- γ GT.** To characterize the enzymes responsible for *in vivo* glutaminase activity of *H. pylori*, we measured this activity level in *H. pylori* strain 26695 and in isogenic single and double mutants carrying deletions of the *ansB* and *ggt* genes. The glutaminase activity level was measured by the production of NH_3 after incubation of whole bacteria with Gln. The wild-type strain produced 2.8 μ mol of NH_3 per mg of bacterial cells after 15 min of incubation with 5 mM Gln, an activity level that was about twice that of Asn deamidation under the same test conditions (Fig. 1B). In the *Δ ggt* and the *Δ ansB Δ ggt* mutants, we measured a strong decrease in glutaminase activity of $\sim 80\%$. The residual Gln deamidation activity of *Δ ggt* mutant was found to increase with time, suggesting that it is carried by another enzyme (see Fig. S1 in the supplemental material). A previous study showed that recombinant Hp-AnsB purified from *E. coli* exhibited

Vol. 78, 2010

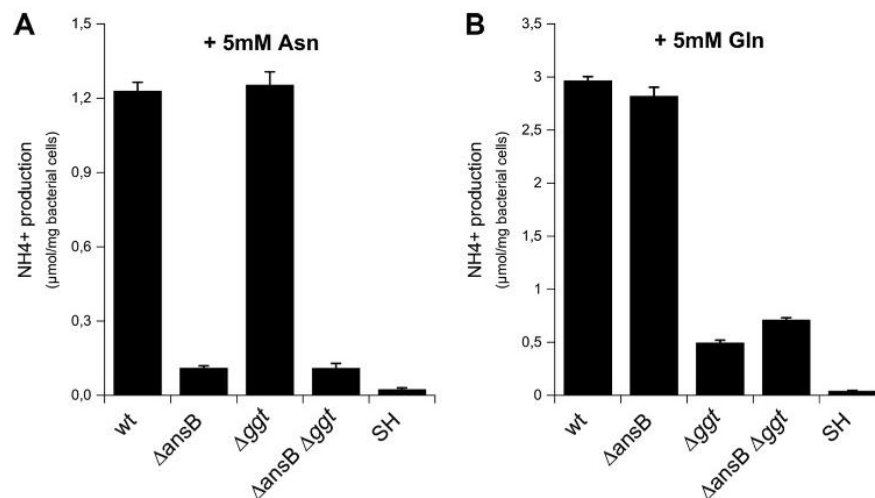
ESSENTIAL AMINO ACID DEAMIDASE-UPTAKE IN *H. PYLORI* 2785

FIG. 1. Ammonia production by *H. pylori*. *H. pylori* parental strain 26695 or the isogenic single or double mutant $\Delta ansB$, Δggt , and $\Delta ansB \Delta ggt$ strains at 3×10^8 bacteria \cdot ml⁻¹ were incubated in phosphate-buffered saline (PBS) with 5 mM Asn or Gln. NH₃ production was measured after 15 min of incubation at 37°C. Asn (A) or Gln (B) hydrolysis, measured by NH₃ production from the parental and mutant strains. Spontaneous hydrolysis (SH) corresponds to the hydrolysis of Gln or Asn under the assay conditions without bacteria. Error bars represent the standard deviations obtained from at least three measurements. wt, wild type.

in vitro asparaginase activity as well as low Gln deamidation activity (11), suggesting that the glutaminase activity observed in the Δggt mutant could be Hp-AnsB dependent. This was not the case in our *in vivo* assay since (i) the glutaminase activities of *H. pylori* 26695 and $\Delta ansB$ strains were comparable and (ii) the $\Delta ansB \Delta ggt$ mutant presented a NH₃ production level similar to that of the single mutant Δggt (Fig. 1B). Taken together, our results demonstrated that Hp-AnsB is not implicated *in vivo* in the production of NH₃ from Gln and that Hp-γGT is the major enzyme with glutaminase activity in *H. pylori*. The residual activity detected in the $\Delta ansB \Delta ggt$ double mutant suggested the existence of another enzyme with weak glutaminase activity that is still to be identified.

Thus, Hp-γGT is responsible for the major part of Gln deamidation and Hp-AnsB is responsible for the major part of Asn deamidation in *H. pylori*.

Identification and characterization of the sole *H. pylori* glutamate transporter Hp-GltS. During its growth, *H. pylori* takes up large amounts of amino acids, with Gln and Glu being among the most consumed (33, 52). No specific carriers of these amino acids have been characterized in *H. pylori*. A previous study showed that the uptake of Gln and Glu is carried out by an unknown sodium-dependent transporter (49). We found that *gltS* (*hp1506*), annotated to exhibit homology to Na⁺/Glu symporters, is a good candidate for glutamate uptake in *H. pylori*.

In order to characterize amino acid transport in *H. pylori*, we measured the uptake of L-[U-¹⁴C]Glu, L-[U-¹⁴C]Gln, and L-[U-¹⁴C]Asp by whole cells of the *H. pylori* 26695 wild-type strain and its isogenic $\Delta gltS$ mutant. There was a rapid accumulation of radiolabeled Glu and Gln in the wild-type strain but no detectable intracellular radioactivity in the $\Delta gltS$ mutant after 14 min (Fig. 2). These results indicated that Glu and Gln are incorporated in an Hp-GltS-dependent way. The wild-type and the $\Delta gltS$ strains rapidly incorporated radiolabeled Asp, indi-

cating that Asp transport does not depend on Hp-GltS (data not shown).

Unlike the *H. pylori* 26695 wild-type strain, the Δggt mutant is unable to incorporate radiolabeled Gln, while Glu transport in this mutant was unaffected (Fig. 2). As the Gln used is radiolabeled on every carbon, the result also showed that no degradation product of this amino acid was incorporated in the Δggt mutant. These results indicated that Gln transport is exclusively dependent on its deamidation into Glu by the periplasmic Hp-γGT activity.

Our results demonstrated that Hp-GltS is an amino acid transporter, allowing Glu-specific incorporation but not that of Gln or Asp. Thus, we concluded that Hp-GltS, which was previously found to be essential for colonization in the Mongolian gerbil model in a signature-tagged mutagenesis study (28), is the sole Glu transporter in *H. pylori*.

Identification and characterization of the sole *H. pylori* aspartate transporter. In addition to the consumption of large amounts of Glu and Gln, *H. pylori* preferentially uses other amino acids such as Asn and Asp (52). Again, no specific carrier of these amino acids has been identified in *H. pylori*. We found that the *hp0724* gene (*dcuA*), adjacent to the asparaginase, has homology to anaerobic C₄-dicarboxylate transport proteins. As Asp is a C₄-dicarboxylate, a $\Delta dcuA$ mutant was constructed in strain 26695. To test the physiological implication of Hp-DcuA in the incorporation of Asp, we measured the uptake of L-[U-¹⁴C]Asp by *H. pylori* strain 26695 and by the isogenic $\Delta dcuA$ mutant. Rapid accumulation of radiolabeled Asp was measured in *H. pylori* 26695 but not in the $\Delta dcuA$ mutant (Fig. 3A). These results demonstrate that DcuA is the sole Asp transporter in *H. pylori* 26695.

The *H. pylori* asparaginase is active in the periplasm. As it is annotated, open reading frame (ORF) *hp0723* (*ansB*) did not contain a sequence encoding a signal peptide. Close examination of the *H. pylori* 26695 genomic sequence revealed an

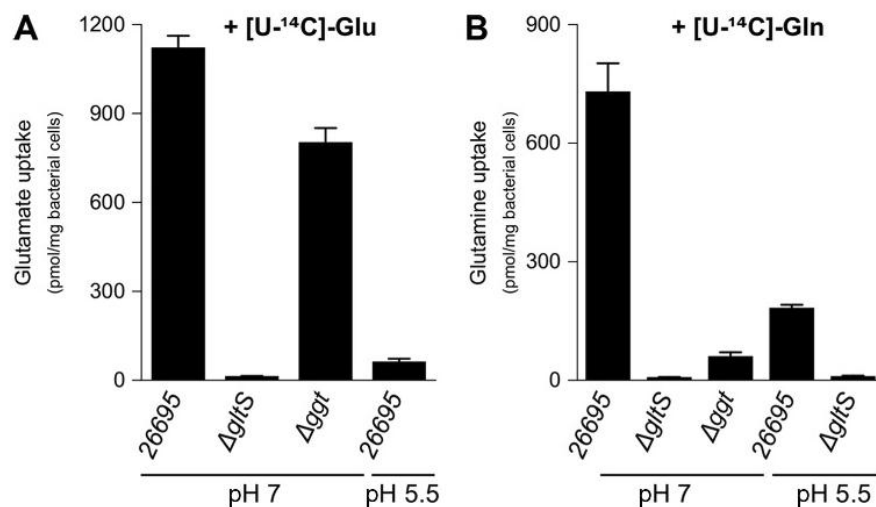


FIG. 2. Uptake of Glu and Gln by *H. pylori*. Incorporation of radiolabeled Glu or Gln by the *H. pylori* 26695 parental strain or by Δ *gltS* and Δ *ggt* mutants at pH 7 or at pH 5.5. Measurements were performed after 14 min of incubation of the bacteria in 5 mM MES buffer and 150 mM NaCl. Uptake was initiated by the addition of 1.98 μ M L-[U-¹⁴C]Glu (A) or 1.96 μ M L-[U-¹⁴C]Gln (B). Error bars represent the standard deviations obtained from at least three measurements.

alternative start codon preceded by a Shine-Dalgarno sequence upstream of *hp0723*, including a characteristic signal peptide conserved in all available *Helicobacter* species (see Fig. S2 in the supplemental material), suggesting that Hp-AnsB is secreted.

To test whether Hp-AnsB activity is periplasmic, two experiments were performed. First, we measured the uptake of L-[U-¹⁴C]Asp by *H. pylori* 26695 and by its isogenic Δ *ansB* mutant with or without an excess of cold Asn. Without the addition of Asn, transport of radiolabeled Asp was comparable in the wild-type 26695 strain and the Δ *ansB* mutant (Fig. 3B). In contrast, the addition of 0.2 mM Asn inhibited the uptake of ¹⁴C-labeled Asp in wild-type *H. pylori* 26695 but not in the Δ *ansB* mutant. If asparaginase was active inside the bacterium, Asp production by Hp-AnsB-dependent Asn hydrolysis should not affect the incorporation of radiolabeled Asp by *H. pylori*. In contrast, if asparaginase were active in the periplasm, Hp-AnsB production of Asp resulting from hydrolysis of cold Asn should compete and inhibit the accumulation of ¹⁴C-labeled Asp in *H. pylori*. These results demonstrated that Hp-AnsB is active in the periplasm of *H. pylori*. Moreover, the results imply that Asn is not a substrate for DcuA, since Asn does not inhibit uptake of Asp in the absence of the periplasmic asparaginase activity.

To strengthen these data, we directly measured the uptake of L-[U-¹⁴C]Asn by *H. pylori* 26695 and its isogenic Δ *ansB* mutant. We observed that unlike the *H. pylori* 26695 wild-type strain, the Δ *ansB* mutant was unable to incorporate radiolabeled Asn (Fig. 3C).

These results indicated that Asn is exclusively transported by an indirect pathway involving a prior step of deamidation into Asp by Hp-AnsB, whose activity is restricted to the periplasm.

The sole aspartate transporter of *H. pylori* is essential for *in vivo* colonization. To evaluate the importance of Hp-DcuA activity *in vivo*, we compared the abilities of the SS1 strain, a

mouse-adapted *H. pylori* strain (30), and its isogenic Δ *dcuA* mutant to colonize orogastrically inoculated NMRI mice. Animals were sacrificed after 1 month. The stomachs were removed from the animals, and colonization by SS1 and the Δ *dcuA* mutant was assessed by quantitative culturing of the stomachs homogenates (17). Contrary to the SS1 parental strain, the SS1 Δ *dcuA* mutant was not recovered from any of the infected animals (Fig. 4). These results indicated that the Δ *dcuA* mutant is unable to colonize the mouse stomach. This demonstrated that Hp-DcuA is essential for the establishment of an infection by *H. pylori*.

pH modulation of the coupled amino acid deamidase-transport systems. Since *H. pylori* is facing significant changes in the pH of the stomach, we examined whether the expression of the *ansB*, *ggt*, *gltS*, and *dcuA* genes responded to pH variation. *H. pylori* cultures were performed at pH 5 or 7 during one generation time, as previously described (8). Expression of the *ansB*, *ggt*, *dcuA*, and *gltS* genes was measured by quantitative real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR). For all genes studied, pH-dependent changes in the amount of the corresponding mRNAs did not exceed 2-fold. At pH 5, the *ggt* gene is slightly induced (fold change, 1.42) and other genes are slightly repressed (fold changes, 0.62 for *gltS*, 0.57 for *ansB*, and 0.70 for *dcuA*). This showed that there is no major effect of pH on gene regulation at the transcriptional level.

We examined Asp, Asn, Glu, and Gln incorporation at neutral and acidic pHs. Uptake of L-[U-¹⁴C]Asp, L-[U-¹⁴C]Asn, L-[U-¹⁴C]Glu, and L-[U-¹⁴C]Gln by *H. pylori* 26695 was measured at pH 7 and pH 5.5. For each of these four amino acids, we observed an accumulation of radioactivity in the bacteria at neutral pH that was strongly diminished at acidic pH (Fig. 2 and 3). These results indicated that, at pH 5.5 in *H. pylori* 26695, accumulation of Asp, Asn, Glu, and Gln is strongly diminished. Since Asp and Glu accumulation in *H. pylori* was pH dependent, we asked whether the periplasmic producers of

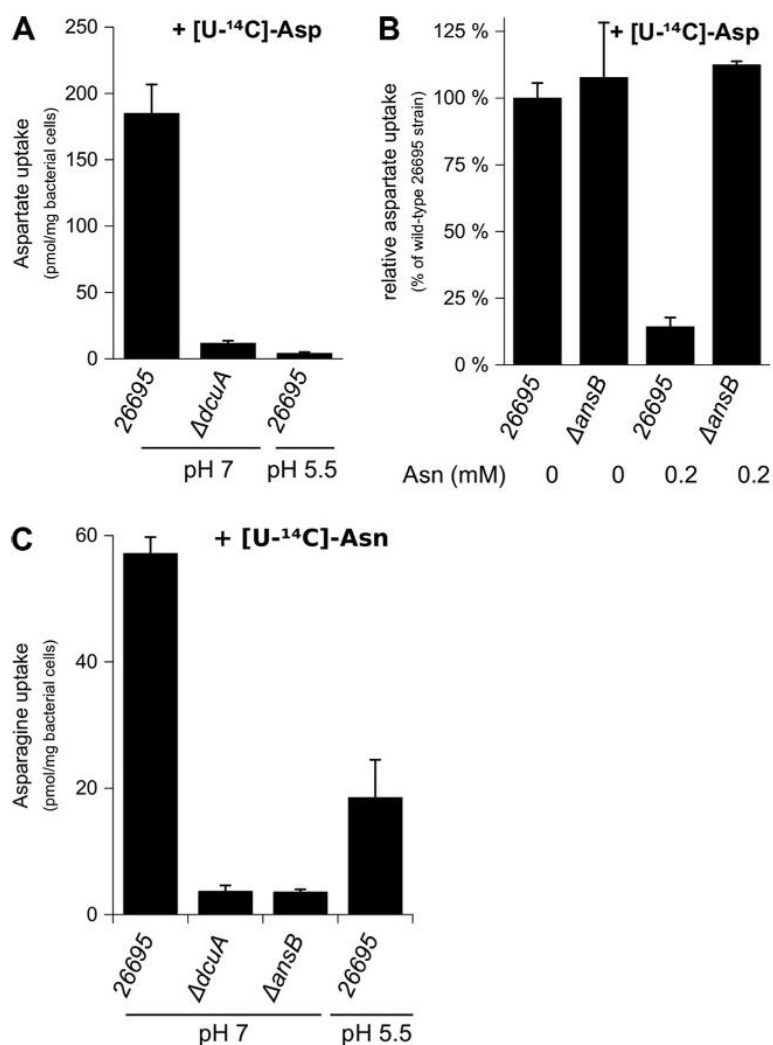


FIG. 3. Uptake of Asp and Asn by *H. pylori*. Incorporation of radiolabeled Asp or Asn by the *H. pylori* 26695 parental strain or by the $\Delta dcuA$ and $\Delta ansB$ mutants at pH 7 or at pH 5.5. Measurements were performed after 14 min of incubation of the bacteria in 5 mM MES buffer and 150 mM NaCl. (A) Uptake was initiated by the addition of 2 μ M L-[U-¹⁴C]Asp. (B) Relative uptake of radiolabeled Asp at pH 7 by *H. pylori* strains without or with the addition of 0.2 mM cold Asn compared to that of the parental *H. pylori* 26695 strain without added Asn. (C) Uptake was initiated by the addition of 2 μ M L-[U-¹⁴C]Asn. Error bars represent the standard deviations obtained from at least three measurements.

Glu and Asp (Hp- γ GT and Hp-AnsB, respectively) were also pH regulated.

To test this hypothesis, the pH response profiles of the Hp- γ GT and the Hp-AnsB activities were measured in whole cells of the *H. pylori* 26695 wild-type strain or the Δggt and $\Delta ansB$ isogenic mutants. During the assay, pH variations caused by NH₃ production were controlled to be negligible, and viability of the bacteria was maintained (data not shown) (see Fig. S3 in the supplemental material). Under the assay conditions used, the spontaneous hydrolysis (SH) of Gln and Asn is negligible, indicating that NH₃ production from these amino acids is exclusively dependent on the presence of *H. pylori* (Fig. 5). Both deamidase activities present a maximum at neutral pH and decline rapidly below pH 5.5 (Fig. 5). Urease

activities measured under the same conditions with 5 mM urea were 17.9 and 64.4 μ mol of NH₃ per mg bacterial cells at pH 7 and 4, respectively.

Thus, Hp- γ GT and Hp-AnsB activities are pH modulated and form two coherent incorporation pathways together with their respective sole transporters, Hp-GltS and Hp-DcuA.

Distribution of the *ansB*, *ggt*, *gltS*, and *dcuA* genes among *Helicobacter* species. Since we showed that *H. pylori* possesses two coupled incorporation pathways (AnsB plus DcuA and γ GT plus GltS) important for the colonization of the stomach, we examined the distribution of the *ansB*, *ggt*, *gltS* and *dcuA* genes in 12 gastric (10 *H. pylori* strains and 2 other gastric *Helicobacter* sp. strains) and 6 enterohepatic *Helicobacter* species, for which entire genomic sequences are available (Table

2788 LEDUC ET AL.

INFECT. IMMUN.

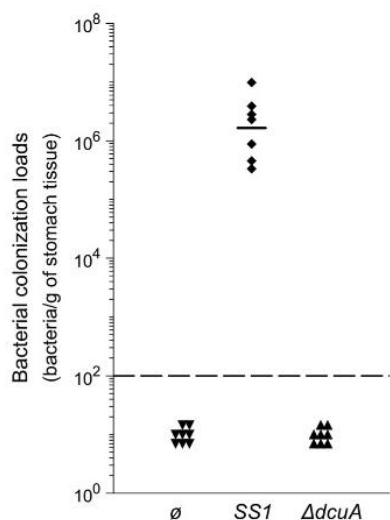


FIG. 4. The *dcuA* gene is required for mouse stomach colonization by the *H. pylori* SS1 strain. Each point corresponds to the colonization load for one mouse. The solid horizontal bar represents the geometric mean for the mice infected by SS1 wild-type strain. The detection limit is shown by a dashed horizontal line.

2). For this analysis, we added the *ureI*, *ureA*, and *ureB* genes that encode the pH-regulated urea transporter and the urease structural subunits (7). As reported in Table 2, the *ureA*, *ureB*, *ureI*, *ansB*, *ggt*, *gltS* and *dcuA* genes are present in all *H. pylori* strains and in *Helicobacter acinonychis*, which colonizes the stomachs of large felines. Interestingly, out of these seven genes, the gastric *H. mustelae* strain lacks both *dcuA* and *ansB* genes. The *H. mustelae* genome possesses an open reading frame that potentially encodes a cytoplasmic asparaginase (no signal peptide detected) whose sequence is distant from the AnsB sequences and from the AnsA type I cytoplasmic asparaginases (39). The absence of an AnsB-type periplasmic aspa-

raginase in *H. mustelae* is a characteristic shared with the six enterohepatic *Helicobacter* species examined. A phylogenetic tree of the asparaginases is presented in Fig. S4 in the supplemental material (drawn using TreeView [40]). Indeed, based on a 16S RNA similarity matrix, *H. mustelae* has been previously shown to be phylogenetically closer to the enterohepatic species than to the gastric species (9, 51). The presence of cytoplasmic asparaginase in *H. mustelae* correlates with this phylogenetic classification. Finally, none of the *ureA*, *ureB*, *ureI*, *ggt*, and *gltS* genes are conserved in every enterohepatic *Helicobacter* species. We concluded that the coupled transport/incorporation pathways described in this study are strictly conserved in *H. pylori* and the closely related *H. acinonychis* and have not been maintained during evolution in the enterohepatic *Helicobacter* species.

DISCUSSION

Here we deciphered in *H. pylori* two coupled deamidase-transport systems active in the periplasm and at the inner membrane, respectively. These systems guarantee the acquisition of amino acids Glu and Asp from Gln and Asn, respectively. As a consequence, these systems simultaneously consume Glu/Gln and Asp/Asn from the environment and produce NH₃ in the periplasm. We showed that (i) Hp-AnsB and Hp-γGT are responsible for asparaginase and glutaminase periplasmic activities, respectively, (ii) Hp-DcuA and Hp-GltS are the specific and sole transporters of Asp and Glu, and (iii) Gln and Asn are exclusively incorporated by indirect pathways, requiring their prior deamidation. Importantly, each of the four functions provided by Hp-AnsB, Hp-DcuA, Hp-γGT, and Hp-GltS is individually essential or very important for colonization of animal models by *H. pylori* (34, 13, 28) and conserved in the *H. pylori* strains.

In contrast to Glu and Asp transport, uptake of the corresponding amides Gln and Asn proceeds through an indirect pathway involving a prior periplasmic deamidation step. Each of these indirect uptake pathways is unique in agreement with the small genome size (1.6 Mb) and the documented low func-

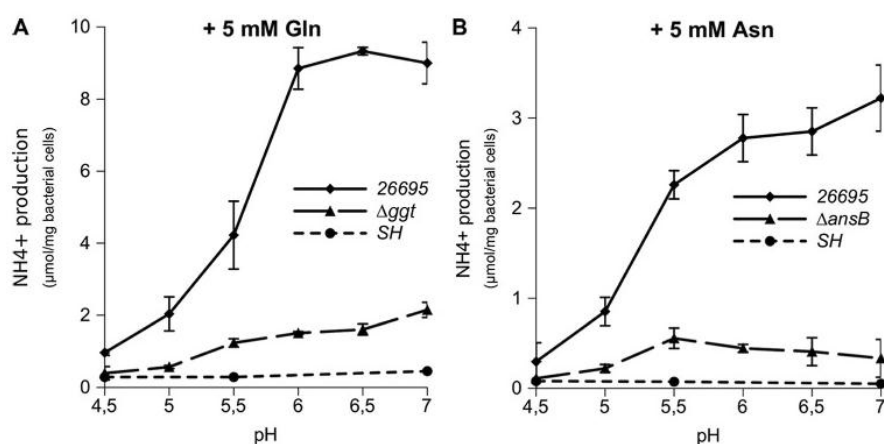


FIG. 5. pH profiles of ammonia production by the *H. pylori* 26695, $\Delta ansB$, and Δggt strains. Catalytic activity of NH₃ production was measured with 3×10^8 bacteria incubated for 30 min in citrate-phosphate buffer adjusted at different pH values at 37°C, with 5 mM Gln (A) or 5 mM Asn (B). SH corresponds to the hydrolysis of Gln or Asn under the assay conditions without bacteria. Error bars represent the standard deviations obtained from at least three measurements.

Vol. 78, 2010

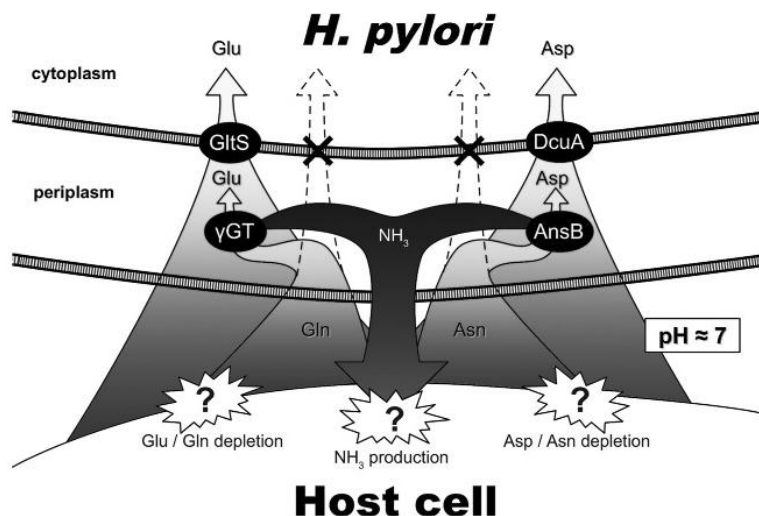
ESSENTIAL AMINO ACID DEAMIDASE-UPTAKE IN *H. PYLORI* 2789

FIG. 6. Schematic representation of the direct and indirect Glu, Gln, Asp, and Asn incorporation pathways associated with ammonia production in *H. pylori*. *H. pylori* (top) is represented in contact with a host epithelial cell (bottom). The proteins described in this work are represented by filled circles. At neutral pH, Glu and Asp are transported directly into the cytoplasm. In contrast, Gln and Asn are exclusively taken up by indirect pathways (illustrated by the two crosses). Gln and Asn hydrolysis in the periplasm generates ammonia plus Glu and Asp, respectively. A model is presented in which these two nonredundant systems participate in *H. pylori* virulence by depleting gastric or immune cells from protective amino acids and producing toxic ammonia in contact with the host cells. Abbreviations: Glu, L-glutamate; Gln, L-glutamine; Asp, L-aspartate; Asn, L-asparagine; NH_3 , ammonia; γGT , γ -glutamyltranspeptidase; AnsB, asparaginase.

tional redundancy of *H. pylori*. On the *H. pylori* 26695 genome, the annotation of HP1169-HP1172 as a putative Gln ABC transporter should be revised, since we demonstrated that *H. pylori* is unable to import Gln directly. In contrast to *H. pylori*, another member of *Campylobacteriales*, *Campylobacter jejuni*, was found to possess different redundant transporters for Asp, Glu, and Gln (22, 31).

In *H. pylori* whole cells, the Hp-GltS/Hp-DcuA transport and the Hp- γGT /Hp-AnsB hydrolysis activities were optimal at neutral pH and rapidly declined at and below pH 5.5. The impact of the external pH on the periplasmic pH is difficult to evaluate. However, the reported pH dependence on the activity of purified recombinant Hp-AnsB presented a distinct profile, with 70% of the activities preserved at pH 4.5 compared to that preserved at pH 7 (11). The pH profiles of Gln hydrolysis measured with purified Hp- γGT were also different. They showed a dramatic decline of the *in vitro* activity below pH 7 (49). In addition, the minimal *in vitro* activity of Hp-AnsB on Gln reported by Cappelletti et al. (11) was not observed by our measurements using whole cells. No major pH-dependent transcriptional regulation was measured for the four genes encoding the two deamidase-uptake systems. Previous transcriptomic studies reported contradictory results for *ansB*, finding either upregulation after a 30-min acid shock in brain heart infusion (BHI) medium (58) or downregulation at pH 5 in brucella broth supplemented with 10% fetal bovine serum (34). None of the transcriptomic analyses of the response to pH (2, 3, 8, 34, 58) identified *dcuA* and *ggt* as acid-responsive genes. In agreement with the present results, we previously found that the expression of the *gltS* gene is slightly downregulated by acidity (8). Thus, functional regulation of the deamidase-transport proteins provides the cell with a strong and

rapid response to pH that would not be achieved by transcriptional regulation of the corresponding genes. Interestingly, the pH responses of the periplasmic NH_3 producers Hp-AnsB and Hp- γGT are precisely inverse to that of urea uptake by the acid-activated urea channel UreI, which optimally provides urea to urease below pH 5 (50, 57).

What is the function of these coupled amino acid uptake and periplasmic NH_3 production systems in *H. pylori*? First, Asp, Asn, Glu, and Gln are four of the eight amino acids most consumed by *H. pylori* (33, 52). In contrast with *E. coli*, *H. pylori* possesses only one sugar transporter and preferentially uses amino acids as a carbon source (33, 52). It is thus possible that the dominant role of these four amino acids is to serve as a carbon source in *H. pylori*. However, none of the *H. pylori* strains examined ($n = 34$) presented auxotrophy for these amino acids (37, 42, 54). Previous observations and our present data point to a role of these systems that is not restricted to nutrient acquisition.

Most interesting is the observation that Gln and Asn are not taken up directly by *H. pylori* (Fig. 6). Analysis of the predicted metabolic pathways of *H. pylori* (25–27) indicated that periplasmic AnsB is the only enzyme using free Asn as a substrate. In addition, it has been demonstrated that in *H. pylori*, neither Asn nor Gln are incorporated directly during protein synthesis. In all *Helicobacter* species, as in several other bacteria, Gln-tRNA^{Gln} and Asn-tRNA^{Asn} are synthesized in the following two steps: (i) Glu and Asp are mischarged on tRNA^{Gln} and tRNA^{Asn}, respectively, and (ii) an amidotransferase complex (GatABC) transfers a molecule of NH_3 from a donor (Gln) to the mischarged tRNA to obtain the correctly loaded aminoacyl-tRNA (47). Thus, it seems that no Asn is required in the cytoplasm, pointing to an original role of the periplasmic as-

paraginase. Gln is not directly incorporated into proteins; however, it is synthesized from Glu by the cytoplasmic and essential glutamine synthetase (GlnA; EC 6.3.1.2). Intracellular Gln serves directly or indirectly as an NH_3 donor for the synthesis of essential molecules such as peptidoglycan precursors and pyrimidine. Paradoxically, instead of directly taking up essential Gln, GlnA cytoplasmically synthesizes Gln from Glu at the cost of ATP and ammonia, again supporting a specific function of Gln periplasmic hydrolysis. In addition, the absence of direct Gln uptake explains why mutations of the *glnA* gene encoding GlnA were lethal in *H. pylori* even under conditions of extracellular Gln supplementation (19).

The fate of periplasmic NH_3 generated by Hp-AnsB and Hp- γ GT is intriguing. Two roles seem unlikely, as follows: (i) use of this NH_3 as a source of nitrogen (indeed, urease activity generates important amounts of intracellular NH_3 that are at least in part incorporated directly into Gln by GlnA [GlnA physically interacts with UreA {53}], and *H. pylori* presents no NH_3 uptake system, such as, for instance, the AmtB transporter), and (ii) this production of ammonia in resistance to strong acidity (the enzymatic activities are specifically optimal at neutral pH). However, we cannot exclude a role of the two periplasmic deamidases in resistance to weakly acidic conditions, like pH 6, under which the enzymes are still fully active (Fig. 5). Interestingly, it was been shown previously that the acid resistance of *H. pylori* in the presence of low concentrations of urea (0.1 mM) is reinforced by the addition of 1 mM Gln (41). In contrast to the acid-activated urease activity, the deamidase-transport pathways are specifically functional at neutral pH, encountered by *H. pylori* inside the gastric mucus near the host epithelial cells or attached to them where they are potentially exposed to the immune system.

The protective effect of dietary Gln in human gastric pathologies (38) and in animal models (23) has been extensively documented. In addition, purified Hp-AnsB and Hp- γ GT proteins present cytotoxic properties (11). Hp- γ GT has been shown to be proapoptotic (48) and to inhibit T-cell proliferation (45). NH_3 was shown to kill gastric epithelial cells in a dose-dependent manner (36). Finally, Gln and Glu protect cultured gastric cells from NH_3 -induced cell death (36), and depletion of glutamine limits the host immune response (43, 45). Asparaginase is used in the treatment of lymphoblastic leukemia because of its ability to deplete the tumor cells from essential Asn (15). The coupled mechanisms described here enable *H. pylori* to acquire nutrients (among which, Glu and Gln) and consequently cause their depletion from the cellular environment of the host with simultaneous ammonia production. Partially in line with Shibayama et al. (49), we propose a model (Fig. 6) that we are presently investigating in which these essential activities have deleterious effects on the immune cells and generate lesions of the epithelial cells by (i) depleting the gastric and immune cells from protective amino acids and/or (ii) delivering NH_3 directly in contact with the epithelial cells.

The *ansB*, *ggt*, *gltS*, and *dcuA* genes are not essential for *H. pylori* growth on plates but are required for full virulence in animal models (34, 13, 28). A previous study using whole-genome microarrays revealed the presence of the *ansB*, *dcuA*, *ggt*, and *gltS* genes in the 56 *H. pylori* strains examined and in the 4 closely related *H. acinonychis* strains available (21). Our

analysis of the distribution of the *ansB*, *dcuA*, *ggt*, and *gltS* genes showed a strong conservation of the sequences in *H. pylori* and *H. acinonychis*. However, genes encoding asparaginases were also detected in gastric *H. mustelae* and in the six enterohepatic *Helicobacter* species examined. A closer analysis of the corresponding proteins by construction of a phylogenetic tree, to which other epsilonproteobacteria were added (*Campylobacter jejuni* and *Wolinella succinogenes*) (see Fig. S4 in the supplemental material), demonstrated the following: (i) characteristic AnsB proteins with signal peptides in *H. pylori* and *H. acinonychis*; (ii) asparaginase without a signal peptide in *H. mustelae*; and (iii) clustering of asparaginases from enterohepatic *Helicobacter* species with those of *Campylobacter* species, associated with a disparity in the prediction of signal peptides (presence or absence) (see Fig. S4 in the supplemental material). Interestingly, a recent study reported that the acquisition of a signal peptide sequence to otherwise cytoplasmic asparaginase enhances the capacity of certain *Campylobacter jejuni* strains to utilize asparagine for *in vitro* growth and to more efficiently colonize the liver (24). However, the impact of asparaginase on radioactive amino acid uptake by the redundant *C. jejuni* transporters was not tested (24). It is tempting to speculate that in the *Campylobacterales*, including *Helicobacter* and *Campylobacter* species, the acquisition of periplasmic localized asparaginase enhances the capacity to colonize specific niches. However, contrary to what we found in *H. pylori* in which the AnsB signal peptide is strictly conserved, the periplasmic localization of *C. jejuni* asparaginase is only strain specific. These data suggest a selective pressure on the stomach-colonizing organisms for the conservation of periplasmic asparaginase. Similarly, the presence of γ GT in some *C. jejuni* strains has been associated with enhanced virulence (24). In contrast with *C. jejuni*, the asparaginase and γ GT activities of *H. pylori* are essential for full colonization, as are the coupled amino acid uptake systems. Such dramatic phenotypes have not frequently been reported in bacterial pathogens.

In conclusion, we showed that *H. pylori* possesses two essential and exclusive coregulated systems involved in amino acid hydrolysis in the periplasm and uptake that are coupled with periplasmic NH_3 production. We propose a model in which these two coupled mechanisms correspond to an original diversion of conventional pathways of amino acids incorporation that might provide *H. pylori* with additional strategies for its proliferation and persistence in the stomach and may participate in the pathogenesis induced by *H. pylori*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cécile Muller for her interest in this work and her help with the qRT-PCR experiments. We thank Jost Enninga, Hannu Myllykallio, and Ivo Boneca for discussions and critical reading of the manuscript.

This work was funded by Projet transversal de recherche (PTR) grant 310 from the Institut Pasteur. D.L. was a recipient of the Bourse Roux-Institut Pasteur postdoctoral fellowship.

REFERENCES

1. Algoood, H. M. S., and T. L. Cover. 2006. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. Clin. Microbiol. Rev. 19:597–613.
2. Allan, E., C. L. Clayton, A. McLaren, D. M. Wallace, and B. W. Wren. 2001. Characterization of the low-pH responses of *Helicobacter pylori* using genomic DNA arrays. Microbiology 147:2285–2292.

3. Ang, S., C. Z. Lee, K. Peck, M. Sindici, U. Matrubutham, M. A. Gleeson, and J. T. Wang. 2001. Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infect. Immun.* **69**:1679–1686.
4. Atherton, J. C. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **1**:63–96.
5. Baumgartner, H. K., and M. H. Montrose. 2004. Regulated alkali secretion acts in tandem with unstirred layers to regulate mouse gastric surface pH. *Gastroenterology* **126**:774–783.
6. Bumann, D., S. Aksu, M. Wendland, K. Janek, U. Zimny-Arndt, N. Sabarth, T. F. Meyer, and P. R. Jungblut. 2002. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **70**:3396–3403.
7. Bury-Moné, S., S. Skouloubris, A. Labigne, and H. De Reuse. 2001. The *Helicobacter pylori* UreI protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol. Microbiol.* **42**:1021–1034.
8. Bury-Moné, S., J. Thiberge, M. Contreras, A. Maitournam, A. Labigne, and H. De Reuse. 2004. Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **53**:623–638.
9. Bury-Moné, S., S. Skouloubris, C. Dauga, J. Thiberge, D. Dailidiene, D. E. Berg, A. Labigne, and H. De Reuse. 2003. Presence of active aliphatic amidases in *Helicobacter* species able to colonize the stomach. *Infect. Immun.* **71**:5613–5622.
10. Busiello, I., R. Acquaviva, A. Di Popolo, T. G. Blanchard, V. Ricci, M. Romano, and R. Zarrilli. 2004. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl-transpeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells. *Cell. Microbiol.* **6**:255–267.
11. Cappelletti, D., L. R. Chiarelli, M. V. Pasqueto, S. Stivala, G. Valentini, and C. Scotti. 2008. *Helicobacter pylori* L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**:1222–1226.
12. Casadaban, M. J., and S. N. Cohen. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**:179–207.
13. Chevalier, C., J. M. Thiberge, R. L. Ferrero, and A. Labigne. 1999. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.* **31**:1359–1372.
14. Chu, S., S. Tanaka, J. D. Kaunitz, and M. H. Montrose. 1999. Dynamic regulation of gastric surface pH by luminal pH. *J. Clin. Invest.* **103**:605–612.
15. Earl, M. 2009. Incidence and management of asparaginase-associated adverse events in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **7**:600–606.
16. Emanuelsson, O., S. Brunak, G. von Heijne, and H. Nielsen. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* **2**:953–971.
17. Ferrero, R. L., J. M. Thiberge, M. Huerre, and A. Labigne. 1998. Immune responses of specific-pathogen-free mice to chronic *Helicobacter pylori* (strain SS1) infection. *Infect. Immun.* **66**:1349–1355.
18. Foster, J. W. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:898–907.
19. Garner, R. M., J. Fulkerson, and H. L. Mobley. 1998. *Helicobacter pylori* glutamine synthetase lacks features associated with transcriptional and post-translational regulation. *Infect. Immun.* **66**:1839–1847.
20. Gobert, A. P., D. J. McGee, M. Akhtar, G. L. Mendz, J. C. Newton, Y. Cheng, H. L. Mobley, and K. T. Wilson. 2001. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:13844–13849.
21. Gressmann, H., B. Linz, R. Ghai, K. Pleissner, R. Schlapbach, Y. Yamaoka, C. Kraft, S. Suerbaum, T. F. Meyer, and M. Achtman. 2005. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet.* **1**:e43.
22. Guccione, E., M. D. R. Leon-Kempis, B. M. Pearson, E. Hitchin, F. Mulholland, P. M. van Diemen, M. P. Stevens, and D. J. Kelly. 2008. Amino acid-dependent growth of *Campylobacter jejuni*: key roles for aspartase (AspA) under microaerobic and oxygen-limited conditions and identification of AspB (Cj0762), essential for growth on glutamate. *Mol. Microbiol.* **69**:77–93.
23. Hagen, S. J., M. Ohtani, J. Zhou, N. S. Taylor, B. H. Rickman, G. L. Blackburn, and J. G. Fox. 2009. Inflammation and foveolar hyperplasia are reduced by supplemental dietary glutamine during *Helicobacter pylori* infection in mice. *J. Nutr.* **139**:912–918.
24. Hoffreuter, D., V. Novik, and J. E. Galán. 2008. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe* **4**:425–433.
25. Kanehisa, M., and S. Goto. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**:27–30.
26. Kanehisa, M., M. Araki, S. Goto, M. Hattori, M. Hirakawa, M. Itoh, T. Katayama, S. Kawashima, S. Okuda, T. Tokimatsu, and Y. Yamanishi. 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* **36**:D480–D484.
27. Kanehisa, M., S. Goto, M. Hattori, K. F. Aoki-Kinoshita, M. Itoh, S. Kawashima, T. Katayama, M. Araki, and M. Hirakawa. 2006. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **34**:D354–D357.
28. Kavermann, H., B. P. Burns, K. Angermuller, S. Odenbreit, W. Fischer, K. Melchers, and R. Haas. 2003. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J. Exp. Med.* **197**:813–822.
29. Kim, K., S. Lee, M. Park, J. Song, H. Kang, W. Lee, M. Cho, K. Rhee, H. Yoon, and S. Baik. 2007. Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**:562–567.
30. Lee, A., J. O'Rourke, M. C. De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M. F. Dixon. 1997. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**:1386–1397.
31. Lin, A. E., K. Krastel, R. I. Hobb, S. A. Thompson, D. G. Cvitkovitch, and E. C. Gaynor. 2009. Atypical roles for *Campylobacter jejuni* amino acid ATP binding cassette transporter components PagP and Pa in bacterial stress tolerance and pathogen-host cell dynamics. *Infect. Immun.* **77**:4912–4924.
32. McGovern, K. J., T. G. Blanchard, J. A. Gutierrez, S. J. Czinn, S. Krakowka, and P. Youngman. 2001. γ -Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infect. Immun.* **69**:4168–4173.
33. Mendz, G. L., and S. L. Hazell. 1995. Amino acid utilization by *Helicobacter pylori*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**:1085–1093.
34. Merrell, D. S., M. L. Goodrich, G. Otto, L. S. Tompkins, and S. Falkow. 2003. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **71**:3529–3539.
35. Miller, J. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
36. Nakamura, E., and S. J. Hagen. 2002. Role of glutamine and arginase in protection against ammonia-induced cell death in gastric epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**:G1264–G1275.
37. Nedenskov, P. 1994. Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3450–3453.
38. Okabe, S., K. Takeuchi, Y. Takata, T. Naganuma, and K. Takagi. 1976. Effects of L-glutamine on various gastric lesions in rats and guinea pigs. *Digestion* **14**:325–331.
39. O'Toole, P. W., W. J. Snelling, C. Canchaya, B. M. Forde, K. R. Hardie, C. Josenhans, R. L. Graham, G. McMullan, J. Parkhill, E. Belda, and S. D. Bentley. 2010. Comparative genomics and proteomics of *Helicobacter mustelae*, an ulcerogenic and carcinogenic gastric pathogen. *BMC Genomics* **11**:164.
40. Page, R. D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**:357–358.
41. Rektorschek, M., D. Weeks, G. Sachs, and K. Melchers. 1998. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**:628–641.
42. Reynolds, D. J., and C. W. Penn. 1994. Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology* **140**:2649–2656.
43. Roth, E. 2008. Nonnutritive effects of glutamine. *J. Nutr.* **138**:2025S–2031S.
44. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
45. Schmees, C., C. Prinz, T. Treptau, R. Rad, L. Hengst, P. Voland, S. Bauer, L. Brenner, R. M. Schmid, and M. Gerhard. 2007. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* **132**:1820–1833.
46. Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. Werling, C. Josenhans, and S. Suerbaum. 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:5024–5029.
47. Sheppard, K., P. Akochy, J. C. Salazar, and D. Söll. 2007. The *Helicobacter pylori* amidotransferase GatCAB is equally efficient in glutamine-dependent transamidation of Asp-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln}. *J. Biol. Chem.* **282**:11866–11873.
48. Shibayama, K., K. Kamachi, N. Nagata, T. Yagi, T. Nada, Y. Doi, N. Shibata, K. Yokoyama, K. Yamane, H. Kato, Y. Iinuma, and Y. Arakawa. 2003. A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **47**:443–451.
49. Shibayama, K., J. Wachino, Y. Arakawa, M. Saidijam, N. G. Rutherford, and P. J. F. Henderson. 2007. Metabolism of glutamine and glutathione via gamma-glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism. *Mol. Microbiol.* **64**:396–406.
50. Skouloubris, S., J. M. Thiberge, A. Labigne, and H. De Reuse. 1998. The *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infect. Immun.* **66**:4517–4521.
51. Solnick, J. V., and D. B. Schauer. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:59–97.
52. Stark, R. M., M. S. Suleiman, I. J. Hassan, J. Greenman, and M. R. Millar.

2792 LEDUC ET AL.

INFECT. IMMUN.

1997. Amino acid utilisation and deamination of glutamine and asparagine by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **46**:793–800.
53. Stengl, K., K. Schauer, C. Ecobichon, A. Labigne, P. Lenormand, J. Rouselle, A. Namane, and H. de Reuse. 2008. In vivo interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. *Mol. Cell. Proteomics* **7**:2429–2441.
 54. Testerman, T. L., P. B. Conn, H. L. T. Mobley, and D. J. McGee. 2006. Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1650–1658.
 55. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
 56. Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Wattley, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539–547.
 57. Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs. 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**:482–485.
 58. Wen, Y., E. A. Marcus, U. Matrubutham, M. A. Gleeson, D. R. Scott, and G. Sachs. 2003. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **71**:5921–5939.
 59. Wood, J. M. 2007. Bacterial osmosensing transporters. *Methods Enzymol.* **428**:77–107.

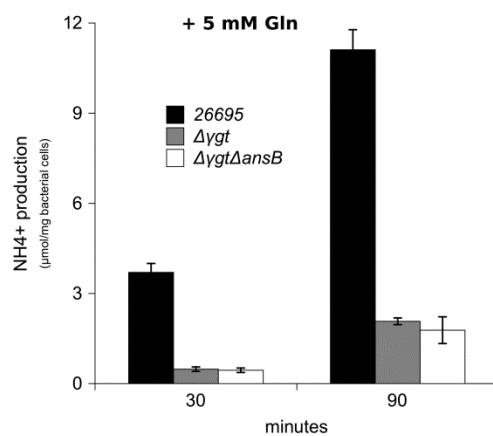
Editor: J. N. Weiser

Supplemental Material

Suppl. table I. Oligonucleotides used in this study.

Sequence	Location
Oligonucleotides used for inactivation	
5' -CTCACTTCCACAATCACCGGG-3'	<i>ansB</i>
5' -CGGATCTGTTGAAGGGCGGTTTTGAGCCATAACCTGCCCC-3'	<i>ansB</i>
5' -TGGCAGGGCGGGGCGTAATAGGGTGCTTTTACAACCTCGC-3'	<i>ansB</i>
5' -GAAAGAACAACAAGCTCTCCG-3'	<i>ansB</i>
5' -GCATTACGCATCGCTCCCACC-3'	<i>dcuA</i>
5' -GTTAGTCACCCGGGTACAAAGGCATCAACCATTAAACCC-3'	<i>dcuA</i>
5' -TACCTGGAGGGAATAATGCCAACGATAAAAAGCTTGGCG-3'	<i>dcuA</i>
5' -CTCTTCTTCTGATATATGGAC-3'	<i>dcuA</i>
5' -CCGGTAAAATCAACACGGACG-3'	<i>rgt</i>
5' -GTTAGTCACCCGGGTACCTATCACACCCAAGCCAATCG-3'	<i>rgt</i>
5' -CTGGATGAATTGTTTTAGTATTTTTTGGGATGGAGGGGG-3'	<i>rgt</i>
5' -AAAAGAACATAAGCAAGCGGC-3'	<i>rgt</i>
5' -GGCCCTATCAAACGCCCATTG-3'	<i>gltS</i>
5' -GTTAGTCACCCGGGTACGCACACCAAAGTGGCATAAATATC-3'	<i>gltS</i>
5' -TACCTGGAGGGAATAATGGCGGCGGTGTTGTGCGCGGG-3'	<i>gltS</i>
5' -CAGTCTGTAAAAGCGTTATCGTGG-3'	<i>gltS</i>
Oligonucleotides used for qRT-PCR	
5' -TGGGTAATGGGAATGTGAGC-3'	<i>ansB</i>
5' -TCACCGCTATTTACCTTGCT-3'	<i>ansB</i>
5' -TTTATCGGTGGGGTTGTAGC-3'	<i>dcuA</i>
5' -AATCGCGTGATCTCTGCCTA-3'	<i>dcuA</i>
5' -CAGCCAGATACGGTTACGC-3'	<i>rgt</i>
5' -CCACCTGTCCGCTACAGAAT-3'	<i>rgt</i>
5' -TCATGTTAGCGCGTCAGTTT-3'	<i>gltS</i>
5' -CGCTCAAACCAATGGTGATA-3'	<i>gltS</i>

Suppl. figure 1.

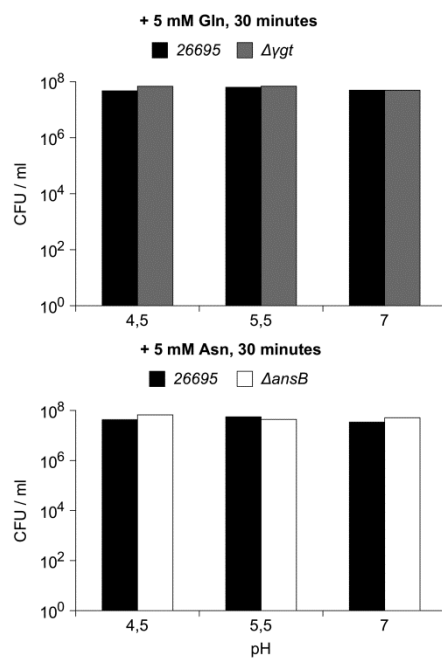


NH₃ production from 5 mM Gln by *H. pylori* 26695 parental strain or by isogenic mutants. Catalytic activity of NH₃ production was measured after 30 and 90 minutes incubation at 37°C. Error bars represent the standard deviation obtained with at least three measurements.

		10	20	30	40	50	60	70	80
<i>Hp26695</i> ATG annot.								
<i>Hp26695</i> ATG pred. (0.989)		----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
<i>HpP12*</i> (0.989)		MRFFLLLLILLFCLKGQVMAQNLP	TIALLATG	GTIAGSCASASG	SYKSGELG	IKELLKAIP	SLNKLARIQ	GEQCHSNIGS	
<i>HpHPAG1*</i> (0.990)		MRFFLLLLILLFCLKGQVMAQNLP	TIALLATG	GTIAGSCASASG	SYKSGELG	IKELLKAIP	SLNKLARIQ	GEQCHSNIGS	
<i>HpB38*</i> (0.998)		MRFFLLLLILLFCLKGQVMAQNLP	TIALLATG	GTIAGSCTAS	SGSGYKSGELG	IKELLKAIP	SLNKLARIQ	GEQCHSNIGS	
<i>HpG27</i> (0.990)		MRFFLLLLILLFCLKGQVMAQNLP	TIALLATG	GTIAGSCASTSS	SGSYKSGELG	IKELLKAIP	SLNKLARIQ	GEQCHSNIGS	
<i>HpJ99*</i> (0.981)		MRFFLLLLILLFCLKGQVMAQNLP	TIALLATG	GTIAGSCVDAS	SGSYKSGELG	IKELLKAIP	SLNKLARIQ	GEQCHSNIGS	
<i>H. acinonychis</i> (0.993)		MRFFLLFILLFCLKGQVMAQNLP	TIALLATG	GTIAGSCANASS	CNYSKSELG	IKELLKAIP	SLNKLARIQ	GEQCHSNIGS	
<i>E. coli</i> K12 (1.000)		MEFFRLTALAALVMGFSGAALAL	LPITILLATG	GTTIAGGCD	SATKSNITV	GKGVENLV	NAWPLK	DIANVKG	GEQCHVWIGS
								
<i>Hp26695</i> ATG annot.								
<i>Hp26695</i> ATG pred. (0.989)		----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
<i>HpP12</i>		QDMNEEIVWFKLAKRAQELLNDS	RIQGVVITH	GTDTLEESAY	FLNLVLR	STKPVVLV	GAMRNAAS	LSDAGAL	NLYNAISVA
<i>HpHPAG1</i>		QDMNEEIVWFKLAKRAQELLNDS	RIQGVVITH	GTDTLEESAY	FLNLVLR	STKPVVLV	GAMRNAAS	LSDAGAL	NLYNAISVA
<i>HpB38</i>		QDMNEEIVWFKLAKRAQELLNDS	RIQGVVITH	GTDTLEESAY	FLNLVLR	STKPVVLV	GAMRNAAS	LSDAGAL	NLYNAISVA
<i>HpG27</i>		QDMNEEIVWFKLAKRAQELLNDS	RIQGVVITH	GTDTLEESAY	FLNLVLR	STKPVVLV	GAMRNAAS	LSDAGAL	NLYNAISVA
<i>HpJ99</i>		QDMNEEIVWFKLAKRAQELLNDS	RIQGVVITH	GTDTLEESAY	FLNLVLR	STKPVVLV	GAMRNAAS	LSDAGAL	NLYNAISVA
<i>H. acinonychis</i>		QDMNEEIVWFKLAKRAQELLNDS	RIQGVVITH	GTDTLEESAY	FLNLVLR	STKPVVLV	GAMRNAAS	LSDAGAL	NLYNAISVA
<i>E. coli</i> K12		QDMNDNVNLTAKKINT--DCDKT	CGVITHGT	DTLEETAY	FLNLTVK	CKPKVVLV	GAMRPST	MSADGP	NLYNAVTTA
								
<i>Hp26695</i> ATG annot.								
<i>Hp26695</i> ATG pred. (0.989)		----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
<i>HpP12</i>		LNEKSANKGVLLVMDDNIFSA	REVKTHHT	TSTFKALNS	GAIGSVY	GKTRYVMQ	PLRKHTTE	SEFSL	SOLKTPLPKVD
<i>HpHPAG1</i>		LNEKSANKGVLLVMDDNIFSA	REVKTHHT	TSTFKALNS	GAIGSVY	GKTRYVMQ	PLRKHTTE	SEFSL	SOLKTPLPKVD
<i>HpB38</i>		LNEKSANKGVLLVMDDNIFSA	REVKTHHT	TSTFKALNS	GAIGSVY	GKTRYVMQ	PLRKHTTE	SEFSL	SOLKTPLPKVD
<i>HpG27</i>		LNEKSANKGVLLVMDDNIFSA	REVKTHHT	TSTFKALNS	GAIGSVY	GKTRYVMQ	PLRKHTTE	SEFSL	SOLKTPLPKVD
<i>HpJ99</i>		LNEKSANKGVLLVMDDNIFSA	REVKTHHT	TSTFKALNS	GAIGSVY	GKTRYVMQ	PLRKHTTE	SEFSL	SOLKTPLPKVD
<i>H. acinonychis</i>		LNEKSANKGVLLVMDDNIFSA	REVKTHHT	TSTFKALNS	GAIGSVY	GKTRYVMQ	PLRKHTTE	SEFSL	SOLKTPLPKVD
<i>E. coli</i> K12		ADKASANKGVLLVMDDNIFVLD	GRDVTKTNTD	VAFTKSNVY	GLCYIHN	GKIDYQRT	EARKHT	SDTFED	VSRLN-ELPKVG
								
<i>Hp26695</i> ATG annot.								
<i>Hp26695</i> ATG pred. (0.989)		----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
<i>HpP12</i>		IIYTHAGMTPDLFQASINSH	AKGVVIAG	VGNNGNV	SAGFLK	AMOBAS	OMGVVIV	RSSRVSG	CGVITS-GEIDDKRA--FTTSD
<i>HpHPAG1</i>		IIYTHAGMTPDLFQASINSH	AKGVVIAG	VGNNGNV	SAGFLK	AMOBAS	OMGVVIV	RSSRVSG	CGVITS-GEIDDKRA--FTTSD
<i>HpB38</i>		IIYTHAGMTPDLFQASINSH	AKGVVIAG	VGNNGNV	SAGFLK	AMOBAS	OMGVVIV	RSSRVSG	CGVITS-GEIDDKRAYGFTTSD
<i>HpG27</i>		IIYTHAGMTPDLFQASINSH	AKGVVIAG	VGNNGNV	SAGFLK	AMOBAS	OMGVVIV	RSSRVSG	CGVITS-GEIDDKRAYGFTTSD
<i>HpJ99</i>		IIYTHAGMTPDLFQASINSH	AKGVVIAG	VGNNGNV	SAGFLK	AMOBAS	OMGVVIV	RSSRVSG	CGVITS-GEIDDKRAYGFTTSD
<i>H. acinonychis</i>		IIYTHAGMTPDLFQASINSH	AKGVVIAG	VGNNGNV	SAGFLK	AMOBAS	OMGVVIV	RSSRVSG	CGVITS-GEIDDKRAYGFTTSD
<i>E. coli</i> K12		IVVNYANASDLPAHALVD	AGYDGVIS	AGVGNGL	LYKSVD	TLATAAKT	CAVVRSS	RVPTECAT	QDAEIVDDAKYGVWAS
								
<i>Hp26695</i> ATG annot.								

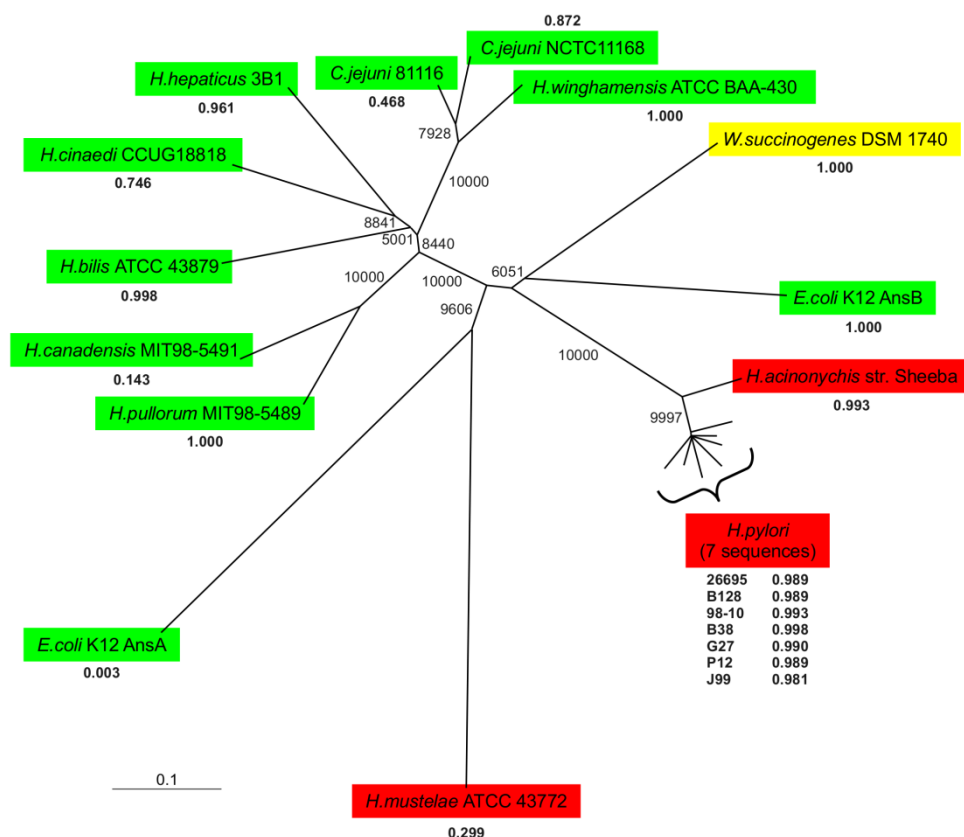
171

Suppl. figure 3.



Survival of *H. pylori* strains in citrate/phosphate buffer after 30 minutes incubation. The colony-forming units per ml (CFU/ml) were determined by enumerating bacteria after serial dilutions.

Suppl. figure 4.



Unrooted phylogenetic tree based on the alignment of 20 asparaginase sequences (AnsA and AnsB) from different *Helicobacter* species, three other epsilon Proteobacteria, two *Campylobacter* and *Wolinella succinogenes*. The cytoplasmic AnsA and periplasmic AnsB asparaginases of *E. coli* were added for comparison. Alignment was performed using ClustalW with default settings (50), followed by manual modifications. The corresponding unrooted tree was constructed by a neighbor joining method and drawing was realized using the Treeview program (40). Numbers at nodes indicate the bootstrap values obtained from 10 000 replicates of the original data set. Branches whose bootstrap values were below 500 have been collapsed. Bold numbers under the names of strains indicate scores obtained for signal peptide detection by SignalP 3.0 (hidden Markov models) (16). The scale bar represents the average number of substitutions per site. Gastric species are high-lightened in red, enterohepatic or enteric species in green and *Wolinella succinogenes* from cattle rumen in yellow.

Chapitre 3. Etude systématique des interactions entre les protéines du métabolisme de l'ammoniac

I. Introduction

L'ammoniac est le composé azoté le plus important chez *H. pylori*. Il est généré en quantité importante par l'uréase et les amidases, mais aussi par l'aspartate-ammonia-lyase (AspA), qui catalyse la déamidation réversible de l'aspartate en fumarate (Fibriansah *et al*, 2011).

H. pylori consomme de grandes quantités d'aspartate et de glutamate (Mendz & Hazell, 1995; Stark *et al*, 1997). De plus, *H. pylori* est incapable de synthétiser les $\text{ARN}_t^{\text{Gln}}$ et $\text{ARN}_t^{\text{Asn}}$ en une seule étape et nécessite l'intervention du complexe Gat (Huot *et al*, 2011; Fischer *et al*, 2012). Puisque *H. pylori* est incapable d'importer la glutamine, la seule façon pour la bactérie de se procurer de la glutamine est de fixer de l'ammoniac sur le glutamate par l'action de la glutamine synthétase GlnA (Leduc *et al*, 2010). De plus, il n'y a pas de voie intracellulaire de biosynthèse de l'asparagine. L'important transport d'aspartate et de glutamate par *H. pylori* pourrait être expliqué par ces deux phénomènes.

La glutamine joue un rôle central dans la physiologie bactérienne, en tant que donneur d'ammoniac pour la synthèse de la paroi et des bases azotées, régulateur de la pression osmotique, source d'azote principal et substrat de nombreuses réactions (Reitzer, 1996; Forchhammer, 2007). Chez *E. coli*, la glutamine synthétase est fortement régulée par ses différents produits (Figure 39). Notamment, quand la glutamine est synthétisée de façon

suffisante, elle stimule une adényltransférase qui transfère une molécule d'AMP au site d'adénylation de GlnA, ce qui inactive l'enzyme par un mécanisme de rétroinhibition. Pour une revue, voir (Leigh & Dodsworth, 2007).

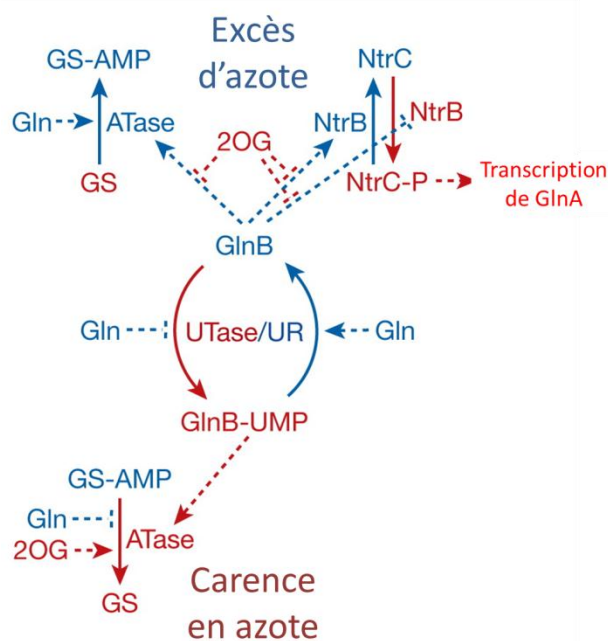


Figure 39 Mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité de la glutamine synthétase chez *E. coli*

Les éléments en bleu indiquent des conditions de suffisance en azote dans la cellule alors que ceux écrits en rouge indiquent une carence cellulaire en azote. 2OG, 2-oxoglutarate ; AMP, adénosine monophosphate ; ATase, adényltransférase ; Gln, glutamine ; GS, glutamine synthétase ; GlnB, protéine régulatrice P-II de la glutamine synthétase ; NtrBC, système à deux composants de régulation de l'azote ; UMP, uridine monophosphate. Les lignes pleines indiquent des modifications et démodifications tandis que les lignes pointillées indiquent le rôle d'effecteurs ou de protéines régulatrices. Les flèches indiquent un effet positif alors que les terminaisons en barres indiquent un effet négatif. Figure adaptée de (Leigh & Dodsworth, 2007).

Le motif d'adénylation canonique de la glutamine synthétase (NLYDLP) est différent chez *H. pylori* (NLFKLT), ce qui empêche sa rétroinhibition par le produit de réaction. En l'absence d'un site d'adénylation fonctionnel, l'activité de la glutamine synthétase est en principe constitutive (Garner *et al*, 1998). De plus, le génome de *H. pylori* ne code pour aucun homologue de la glutamate-oxoglutarate amino-transférase (GOGAT) ; *H. pylori* ne peut donc pas synthétiser de glutamate à partir de la glutamine et de 2-oxoglutarate. L'étude de Stingl *et al* a montré une interaction physique entre l'uréase et la glutamine synthétase chez *H. pylori* (Stingl *et al*, 2008). Les auteurs ont alors proposé qu'un *channeling* de l'ammoniac entre l'uréase et la glutamine synthétase permette un niveau de contrôle supplémentaire de l'activité de GlnA en modulant la disponibilité du substrat. Par ailleurs, ils ont émis l'hypothèse que le transfert

d'ammoniac produit par l'uréase était dirigé vers la glutamine synthétase dans le but d'optimiser le fonctionnement de cette dernière.

Au vu des grandes quantités d'ammoniac synthétisées chez *H. pylori*, nous avons cherché à étudier si d'autres complexes protéiques optimiseraient le flux de l'ammoniac chez cette bactérie.

Nous avons choisi d'étudier 6 protéines : l'aspartate ammonia-lyase, AspA (HP0649), catalysant la formation de fumarate à partir d'aspartate ; l'aspartate amino-déshydrogénase, GdhA (HP0380) qui catalyse la fixation d'une molécule d'ammoniac sur le 2-oxoglutarate pour former du glutamate ; la glutamine synthétase, GlnA (HP0512), UreA (HP0073) et UreB (HP0072), les sous-unités catalytiques de l'uréase. Les fonctions métaboliques de ces différentes enzymes sont résumées figure 40.

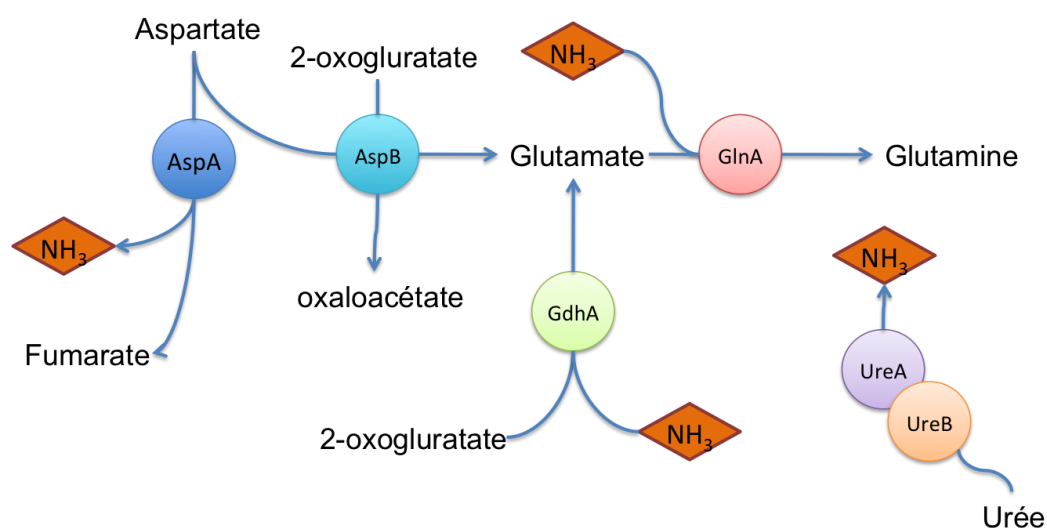


Figure 40 Substrats et produits des réactions catalysées par les protéines du métabolisme de l'ammoniac testées

De manière générale, l'étude des réseaux d'interactions protéiques permet d'assigner aux partenaires une fonction et d'avoir une indication sur le fonctionnement coopératif des voies métaboliques. En effet, si une protéine de fonction inconnue interagit avec une protéine partenaire, il y a une forte probabilité pour que toutes deux soient impliquées dans une même voie métabolique.

De nombreuses méthodes d'études des interactions protéines – protéines ont été appliquées aux procaryotes. La méthode de TAP permet de capturer les complexes multiprotéiques *in vivo* (Puig *et al*, 2001) et a été appliquée avec succès à *H. pylori* dans notre laboratoire (Stingl *et al*, 2008). Bien que très résolutive, cette méthode est lourde à mettre en œuvre et n'a été que peu appliquée aux procaryotes. De plus, dans notre expérience, cette

méthode permet de capturer uniquement les interactions stables présentes dans des complexes abondants. Comme nous cherchons ici à étudier des complexes protéiques appartenant à des voies métaboliques dont certains sont par définition transitoires, les techniques de double hybride s'avèrent ici plus adaptées (Bouveret & Brun, 2012).

Les techniques de double hybride reposent sur les interactions qui s'établissent entre paires de protéines : un appât et une proie. Appât et proie sont fusionnés à deux peptides qui, si l'interaction s'établit, vont reconstituer une activité enzymatique (adénylate cyclase par exemple) ou un régulateur transcriptionnel. Ceci va conduire à l'expression d'un gène rapporteur (généralement *lacZ*) dont l'activité du produit pourra être quantifiée. Même si ces techniques ne permettent pas la mise en évidence de complexes multiprotéiques, elles donnent des indications sur les interactions binaires entre couples de protéines et permettent de définir les réseaux d'interactions de proche en proche.

Le double hybride en système levure (Y2H) a été utilisé avec succès lors d'une étude interactomique à l'échelle globale chez *H. pylori* en collaboration avec notre laboratoire (Rain *et al*, 2001). Cette technique est basée sur la modularité des facteurs de transcription de levure. La protéine appât est fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN alors que la proie est fusionnée au domaine activateur. La plupart du temps le facteur de transcription utilisé est Gal4. L'interaction des deux protéines reconstitue le facteur de transcription et active la transcription du gène rapporteur *lacZ* (Fields & Song, 1989). Cependant, le Y2H se caractérise par un taux de faux positifs élevé et pose un problème méthodologique dès lors que l'expression des protéines procaryotes en système hétérologue peut changer les modifications post traductionnelles des protéines et perturber les interactions.

La méthode de choix pour une étude à large échelle des interactions entre protéines bactériennes est le BACTH. Suivant le même principe que le Y2H, le BACTH consiste à fusionner une protéine appât avec le domaine T18 de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* et la protéine proie avec le domaine T25 (Karimova *et al*, 1998). Ces deux constructions sont réalisées sur deux plasmides différents qui sont cotransformés dans un mutant Δcya de *E. coli*. L'interaction de l'appât avec la proie reconstitue l'activité adénylate cyclase. On a alors synthèse d'AMPc qui se lie sur la protéine CAP (*Catabolite gene Activator Protein*). Le complexe CAP/AMPc se fixe aux promoteurs des gènes cibles. L'interaction peut alors être détectée par son effet indirect sur la transcription de l'opéron lactose (Figure 41) (Karimova *et al*, 1998). Nous avons choisi cette méthode pour réaliser notre étude, menée en collaboration avec Gouzel Karimova dans l'Unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaires de l'Institut

Pasteur.

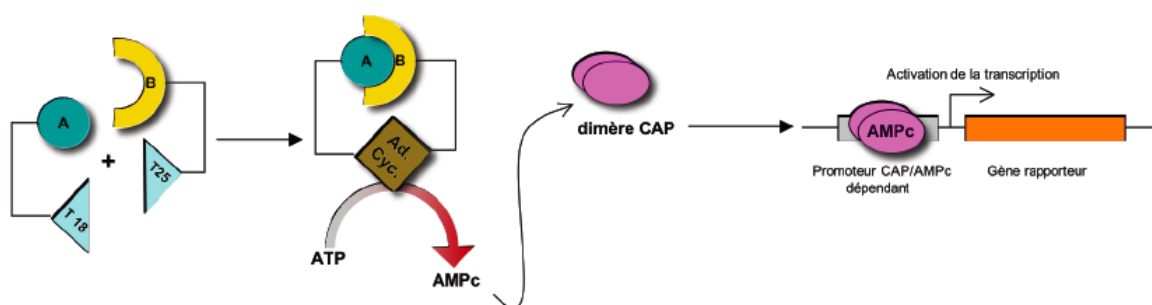


Figure 4I Principe du BACTH (Karimova *et al.* 1998)

2. Matériels et méthodes

2.1. Souches bactériennes et milieux de culture

La souche de *E. coli* MC1061 (Casadaban & Cohen, 1980) a été utilisée pour toutes les étapes de clonage. Les expériences de BACTH ont été menées dans la souche de *E. coli* *cya* BTH101 [F⁻, *cya* 99, *araD*139, *galE*15, *galK*16, *rpsL*1 (*Str*^r), *hsdR*2, *mcrA*1, *mcrB*1] (Karimova *et al.* 2001).

Les souches ont été cultivées en milieu Luria-Bertani, à 37°C. Les antibiotiques suivants ont été ajoutés au milieu en fonction des plasmides transformés : kanamycine, 50 µg.mL⁻¹ ; carbénicilline, 100 µg.mL⁻¹. La capacité des souches à synthétiser la β-galactosidase a été recherchée sur milieu LB contenant les antibiotiques appropriés et 40 µg.mL⁻¹ de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) ainsi que 0,5 mM d'isopropyl-β-D-galactopyranoside (IPTG).

2.2. Construction des plasmides

Les procédures standards ont été suivies pour les PCR, l'analyse des fragments d'ADN, les digestions enzymatiques et les clonages, en respectant les recommandations des fournisseurs (Green & Sambrook, 2012). Les PCR ont été réalisées avec l'enzyme haute-fidélité Phusion Polymerase Finnzymes (Thermo Scientific, Vantaa, Finlande). Les oligonucléotides ont été synthétisés par MWG Biotech (Ebersberg, Allemagne). Les produits de PCR ont été purifiés sur colonne Nucleospin PCR Clean Up de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne).

Nom	Position	Produit PCR cloné dans :				Séquence
		pKT25	pKNT25	pUT18	pUT18C	
H711	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>aspA</i>	✓			✓	CACTCTAGAGATGCGTATTGAGCATG
H712	Rev_ <i>KpnI</i> <i>aspA</i>	✓			✓	CACGGTACCCAGTCTTTATGCTTTTT
H714	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>gdhA</i>	✓			✓	CCCTCTAGACATGTATGTTGAAAAAATTCTCC
H715	Rev_ <i>KpnI</i> <i>gdhA</i>	✓			✓	CATGGTACCTCAAACCCCTTGCGCTAT
H717	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>glnA</i>	✓			✓	CGCTCTAGACATGATAGTAAGAACTCAAA
H718	Rev_ <i>KpnI</i> <i>glnA</i>	✓			✓	CACGGTACCTTAGCATGAATAAGTGGT
H719	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>ureA</i>	✓			✓	CACTCTAGATATGAAACTCACCCCAAAAG
H720	Rev_ <i>KpnI</i> <i>ureA</i>	✓			✓	CACGGTACCTTACTCCTTAATTGTTTTTAC
H721	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>ureB</i>	✓			✓	CGCTCTAGACATGAAAAAGATTAGCAGA
H722	Rev_ <i>KpnI</i> <i>ureB</i>	✓			✓	CACGGTACCTTAGAAAATGCTAAAGAGTT
H723	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>aspB</i>	✓			✓	CGCTCTAGACATGTTGTATTCTCTAAA
H724	Rev_ <i>KpnI</i> <i>aspB</i>	✓			✓	CACGGTACCTTATCCCTTTGATTTGAC
H808	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>ureB</i>		✓	✓		GCGTCTAGACATGAAAAAGATTAGCAGA
H809	Rev_ <i>KpnI</i> <i>ureB</i>		✓	✓		ACGGGTACCGAAAATGCTAAAGAGTT
H810	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>ureA</i>		✓	✓		GCGTCTAGATATGAAACTCACCCCAAAAG
H811	Rev_ <i>KpnI</i> <i>ureA</i>		✓	✓		ACGGGTACCTTACTCCTTAATTGTTTTTAC
H812	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>gdhA</i>		✓	✓		GCGTCTAGACATGTATGTTGAAAAAATTCTCC
H813	Rev_ <i>KpnI</i> <i>gdhA</i>		✓	✓		ACGGGTACCTCAAACCCCTTGCG
H814	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>glnA</i>		✓	✓		GCGTCTAGAATGATAGTAAGAACTCAAA
H815	Rev_ <i>KpnI</i> <i>glnA</i>		✓	✓		ACGGGTACCTTGTCATGAATAAGTGGT
H816	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>aspA</i>		✓	✓		GCGTCTAGAATGCGTATTGAGCATG
H817	Rev_ <i>KpnI</i> <i>aspA</i>		✓	✓		ACGGGTACCTTGCTTTTATGCTTTTTT
H818	Fwd_ <i>XbaI</i> <i>aspB</i>		✓	✓		GCGTCTAGAATGTTGTATTCTCTAAA
H819	Rev_ <i>KpnI</i> <i>aspB</i>		✓	✓		ACGGGTACCTGTCCCTTTGATTTGAC

Tableau 4 Oligonucléotides utilisés dans cette étude

Pour construire les vecteurs utilisés pour le BACTH, l'ADN génomique de la souche 26695 de *H. pylori* (Tomb *et al*, 1997) a été extrait avec le QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen (Venlo, Pays-Bas) et a servi de matrice aux réactions de PCR en vue de produire les inserts d'intérêt. Vecteurs et inserts ont été doublement digérés par les enzymes Fast Digest Fermentas (Thermo Scientific, Vantaa, Finlande) *XbaI* et *KpnI* pour obtenir des extrémités cohésives compatibles. Le vecteur a été déphosphorylé grâce à la phosphatase alcaline FastAP Fermentas (Thermo Scientific, Vantaa, Finlande). La ligation des inserts dans le vecteur a été réalisée par la T4 DNA ligase Fermentas (Thermo Scientific, Vantaa, Finlande) en respectant le rapport 3 moles d'extrémités libres d'insert pour une mole de vecteur. Les plasmides recombinants obtenus ont été transformés par choc thermique dans la souche MC1061 de *E. coli* rendue chimiocompétente par traitement au rubidium (Mulhardt, 2006).

Les plasmides recombinants ont été purifiés par GeneJET Plasmid Miniprep Kit Fermentas (Thermo Scientific, Vantaa, Finlande) et validés par séquençage par GATC (Konstanz, Allemagne).

Nom	Plasmide parent	Caractéristiques ou insert	Résistance	Référence
pKT25		Vecteur utilisé pour fusionner la protéine proie en N _{ter} en phase avec le domaine T25 de CyaA ; p15 ori	KmR	(Karimova <i>et al</i> , 2001)
pKNT25		Vecteur utilisé pour fusionner la protéine proie en C _{ter} en phase avec le domaine T25 de CyaA ; p15 ori	KmR	(Karimova <i>et al</i> , 2001)
pUT18		Vecteur utilisé pour fusionner la protéine appât en C _{ter} en phase avec le domaine T18 de CyaA ; p15 ori	AmpR	(Karimova <i>et al</i> , 2001)
pUT18C		Vecteur utilisé pour fusionner la protéine appât en N _{ter} en phase avec le domaine T18 de CyaA ; p15 ori	AmpR	(Karimova <i>et al</i> , 2001)
pKT25-Zip	pKT25	Plasmide contrôle exprimant le <i>leucine zipper</i> de GCN4 en en C _{ter} du domaine T25 de CyaA	KmR	(Karimova <i>et al</i> , 2001)
pUT18C-Zip	pUT18C	Plasmide contrôle exprimant le <i>leucine zipper</i> de GCN4 en en C _{ter} du domaine T18 de CyaA	AmpR	(Karimova <i>et al</i> , 2001)
pKNT25-Zip	pKNT25	Plasmide contrôle exprimant le <i>leucine zipper</i> de GCN4 en en N _{ter} du domaine T25 de CyaA	KmR	(Karimova <i>et al</i> , 2001)
pUT18-Zip	pUT18	Plasmide contrôle exprimant le <i>leucine zipper</i> de GCN4 en en N _{ter} du domaine T18 de CyaA	AmpR	(Karimova <i>et al</i> , 2001)
pPH02	pKT25	<i>aspA</i> (HP0649)	KmR	Ce travail
pPH03	pKT25	<i>gdhA</i> (HP0380)	KmR	Ce travail
pPH04	pKT25	<i>glnA</i> (HP0512)	KmR	Ce travail
pPH05	pKT25	<i>ureA</i> (HP0073)	KmR	Ce travail
pPH06	pKT25	<i>ureB</i> (HP0072)	KmR	Ce travail
pPH07	pKT25	<i>aspB</i> (HP0672)	KmR	Ce travail
pPH10	pUT18C	<i>aspA</i> (HP0649)	AmpR	Ce travail
pPH11	pUT18C	<i>gdhA</i> (HP0380)	AmpR	Ce travail
pPH12	pUT18C	<i>glnA</i> (HP0512)	AmpR	Ce travail
pPH13	pUT18C	<i>ureA</i> (HP0073)	AmpR	Ce travail
pPH14	pUT18C	<i>ureB</i> (HP0072)	AmpR	Ce travail
pPH15	pUT18C	<i>aspB</i> (HP0672)	AmpR	Ce travail
pPH055	pKNT25	<i>ureB</i> (HP0072)	KmR	Ce travail
pPH056	pKNT25	<i>ureA</i> (HP0073)	KmR	Ce travail
pPH057	pKNT25	<i>gdhA</i> (HP0380)	KmR	Ce travail
pPH058	pKNT25	<i>glnA</i> (HP0512)	KmR	Ce travail
pPH059	pKNT25	<i>aspA</i> (HP0649)	KmR	Ce travail
pPH60	pKNT25	<i>aspB</i> (HP0672)	KmR	Ce travail
pPH064	pUT18	<i>ureB</i> (HP0072)	AmpR	Ce travail
pPH065	pUT18	<i>ureA</i> (HP0073)	AmpR	Ce travail
pPH066	pUT18	<i>gdhA</i> (HP0380)	AmpR	Ce travail
pPH067	pUT18	<i>glnA</i> (HP0512)	AmpR	Ce travail
pPH068	pUT18	<i>aspA</i> (HP0649)	AmpR	Ce travail
pPH069	pUT18	<i>aspB</i> (HP0672)	AmpR	Ce travail

Tableau 5 Plasmides utilisés et construits pour l'étude en BACTH des protéines du métabolisme de l'ammoniac

2.3. Expériences de complémentation fonctionnelle

Les expériences de BACTH ont été réalisées en transformant par paires les plasmides exprimant les protéines appât et proie dans toutes les combinaisons possibles, dans la souche BTH101 rendue compétente par traitement au rubidium (Mulhardt, 2006). Les doubles transformants ont été sélectionnés par étalement sur milieu LB + Carbénicilline + Kanamycine + X-Gal + IPTG.

L'efficacité des interactions entre protéines appât et proie a été mesurée par dosage de l'activité β -galactosidase en milieu liquide, en plaque de microtitration. Les bactéries ont été cultivées la nuit à 30°C en milieu LB contenant 0,5 mM d'IPTG, à raison de 10 colonies isolées par puits. Avant le test, les cultures sont diluées au 1:5 avec du milieu M63 et la densité optique à 595 nm est enregistrée. Les cellules sont ensuite perméabilisées par du SDS et du chloroforme aux concentrations finales respectives de 0,175% et 5%. 20 μ L de suspension sont ajoutés à 105 μ L de tampon PM2 (Na_2HPO_4 , $12\text{H}_2\text{O}$ 70 mM ; NaH_2PO_4 , H_2O 30 mM ; MgSO_4 1 mM ; MnSO_4 0,2 mM ; β -mercaptoéthanol 100 mM ; ONPG 0,1% ; pH 7). La réaction est arrêtée après 25 minutes à température ambiante par ajout de 50 μ L de Na_2CO_3 1M. L'absorbance à 405 nm est enregistrée et l'interaction quantifiée par calcul de l'activité β -galactosidase en unités Miller selon la formule suivante :

$$A = \frac{(DO_{405 \text{ nm}}^{\text{échantillon}} - DO_{405 \text{ nm}}^{\text{standard}}) \div 25}{(DO_{595 \text{ nm}}^{\text{échantillon}} - DO_{595 \text{ nm}}^{\text{standard}})} \div 1000$$

Une unité correspond à l'hydrolyse d'une nmol d'ONPG par minute à 28°C (Pardee & Prestidge, 1959).

3. Résultats

Pour caractériser les interactions physiques entre effecteurs du métabolisme de l'ammoniac chez *H. pylori*, les protéines suivantes, AspA, AspB, GdhA, GlnA, UreA et UreB ont été testées systématiquement par paires, en BACTH. Les gènes codant pour ces protéines ont été clonés dans les plasmides pKT25, pKNT25, pUT18 et pUT18C pour générer des hybrides exprimant les domaines T18 et T25 de CyaA, en N_{ter} ou en C_{ter} .

Pour rechercher les interactions qui s'établissent entre protéines, les vecteurs codant pour les protéines de fusion ont été cotransformés par paires dans la souche de *E. coli* BTH101, mutante pour *cya*. L'efficacité de l'interaction a été mesurée par la quantification de l'activité β -galactosidase des différentes souches, comme décrite dans le paragraphe 2.3 de ce chapitre. Les résultats sont indiqués dans la figure 42 et les valeurs d'activité β -galactosidase des interactions positives sont montrées sur la figure 44.

Le contrôle positif d'interaction est constitué par les couples de plasmides pKT25_Zip + pUT18C_Zip ou pKNT25_Zip + pUT18_Zip. Ces plasmides permettent la complémentarité fonctionnelle par établissement stable d'une interaction entre les deux moitiés du domaine *leucine zipper* de GCN4. Le contrôle négatif d'interaction est donné par la cotransformation du

vecteur portant la fusion de la protéine étudiée avec T18 ou T25 et d'un mélange des plasmides complémentaires.

Une activité deux fois supérieure au niveau de base fourni par un transformant contenant un plasmide appât ou proie avec insert, et un mélange des plasmides complémentaires vides, est considérée comme positive.

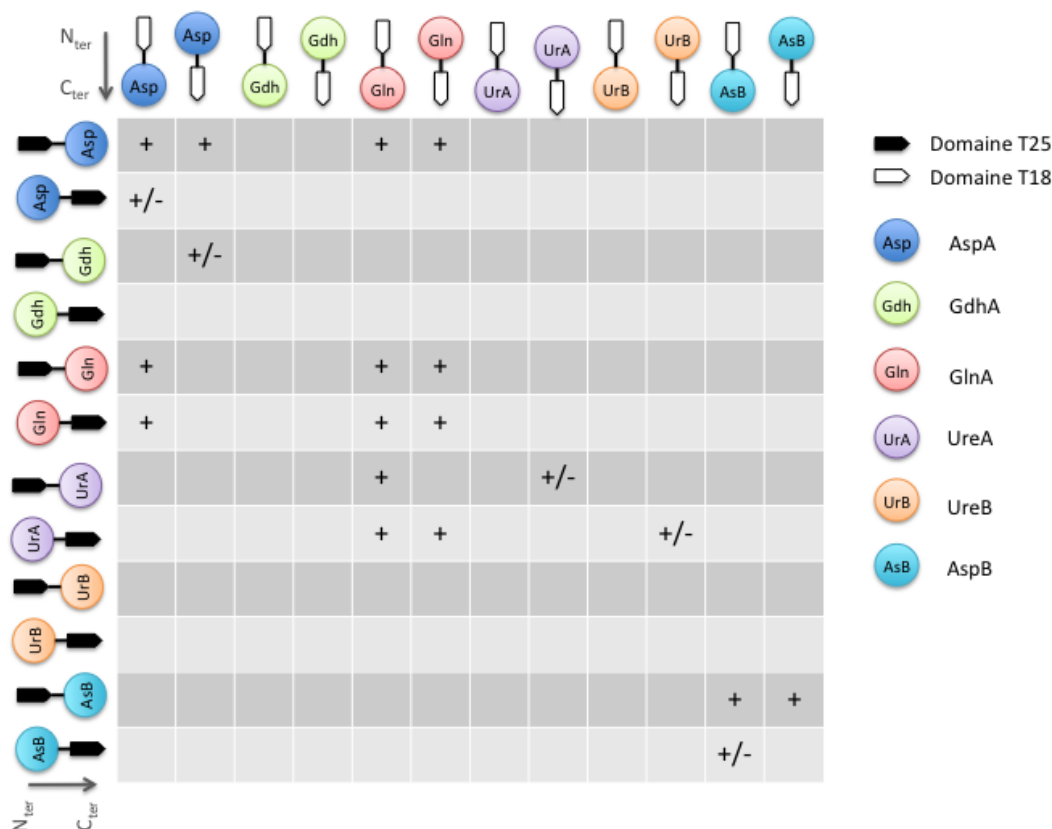


Figure 42 Interactions positives issues du crible des protéines du métabolisme de l'ammoniac en BACTH

+, interaction fortement positive ; +/-, interaction proche du seuil de positivité ou variabilité importante.

La dimérisation de UreA est bien connue. Dans notre étude, elle est détectée avec une faible activité β -galactosidase, uniquement dans la configuration UreA_T18 + T25_UreA. On peut supposer que les encombrements stériques dus aux étiquettes défavorisent l'interaction. L'interaction de UreA avec UreB, pourtant bien documentée dans la littérature, n'est que faiblement détectée dans cette étude et a lieu uniquement dans la configuration UreB_T18 + UreA_T25. Cette interaction ayant déjà été largement documentée, l'activité β -galactosidase associée a servi à déterminer le seuil de positivité de l'expérience.

La protéine AspB n'interagit qu'avec elle-même, et l'interaction est détectée dans la plupart des configurations exceptées pour la combinaison AspB_T18 + AspB_T25. Cela indique que le domaine C_{ter} de la protéine est nécessaire à la multimérisation de la protéine. La structure

cristalline de AspB a été résolue chez *H. pylori* (Joint Center for Structural Genomics, 2008). La structure révèle une organisation en homodimère de la protéine, cohérente avec l'interaction que nous retrouvons.

La protéine AspA interagit avec elle-même dans la plupart des configurations, exceptée la combinaison AspA_T18 + AspA_T25. La quantification des interactions montre que la configuration la plus favorable à l'interaction est T18_AspA + T25_AspA, tandis que l'activité β -galactosidase des combinaisons mixtes est inférieure. Ceci prouve que le domaine C_{ter} de AspA est nécessaire à la multimérisation de la protéine. Ceci est cohérent avec les données de la littérature qui montrent que AspA est un homotétramère chez *E. coli* (Shi *et al*, 1997). Cette étude montre aussi que AspA est structurée en 3 domaines. Un domaine N_{ter} globulaire, un grand domaine central organisé en hélices α parallèles, par lequel s'établit la multimérisation de la protéine, et enfin un domaine C_{ter} formant une boucle mobile (Figure 43). Le domaine d'interaction est bien conservé entre *H. pylori* et *E. coli*. La fusion des domaines T18 et T25 dans la région flexible C_{ter} pourrait déstabiliser l'interaction et serait dans notre cas responsable de la diminution de l'efficacité de l'interaction.

<i>H. pylori</i>	----MRIEHDFIGQMEISDEVYGIQTLRASENFITNDKLCSPVFIKSFQVKKAAAL	56
<i>E. coli</i>	MSNNIRIEEDLLGTRVPADAYGVHTLRAIENFYISNNKISDIPEFVRGMVMVKAAAM	60
	:***.*:.* *:. :.***:**** ***:*:*:.. * *:..: *****:	
<i>H. pylori</i>	ANAQLGLIDEKLIKIAICHACDLLVD-GKYHDQFIVDMIQGGAGTSTNMNMNEVIANLALE	115
<i>E. coli</i>	ANKELQTIPKSVANAIIAACDEVLNNGKCMDQFPVDVYQGGAGTSVMNNTNEVLANIGLE	120
	** : * * :.: ** *** :.: ** *** *: : *****.* ** *:*:*. **	
<i>H. pylori</i>	YMGHQKGEYQFCHPNDHVNRSQSTNDAYPSALKIAIYERLSNLVAPMKALRDAFAQKAKE	175
<i>E. coli</i>	LMGHQKGEYQYLNPNHDVNRQSTNDAYPTGFRIAVYSSLIKLVDAINQLREGFERFAVE	180
	*****.: :*****.:*****.:*:*. * : ** :.: *:.* :.* *	
<i>H. pylori</i>	FAHVIKMGRTQLQDAVPMTLGQEFETYALMVDPRDIEQVLDARNWVREINLGGTAIGTGIN	235
<i>E. coli</i>	FQDILKMGRTQLQDAVPMTLGQEFRAFSILLKEEVNIQRTAELLLEVNLGATAIGTGLN	240
	* :.:*****.:*****.:*:*. * : ** :.: *:.* :.* *	
<i>H. pylori</i>	SHPDYRSLIEKKIQEVTGRPFVMANNLIEATQSTGAYVQVSGVLKRIAVKLSKVCNDLRL	295
<i>E. coli</i>	TPREYSPLAVKLAIEVTGFPCVPAEDLIEATSDCGAYVMVHGALKPLAVKMSKICNDLRL	300
	: : * . * ** : ***** * * *:*****. ***** * .***:***:***:*****	
<i>H. pylori</i>	LSSGPRAGLNEINLPKMQPGSSIMPGKVNPIPEVVNQVCFVIGNDLSVALAAEGGQLQ	355
<i>E. coli</i>	LSSGPRAGLNEINLPELQAGSSIMPAKVNPIPEVVNQVCFVIGNDTSVTMAAEAGQLQ	360
	*****.:*:*****.*****.:***** ***** :*:***.***	
<i>H. pylori</i>	LNVEFPVIAKLFHSFVILGRAIETLTTCVEGITANEKICHYVFNSIGIVTALNPHIG	415
<i>E. coli</i>	LNVEFPVIGQAMFESVHILTACYNLLEKICNGITANEVCEGYVNSIGIVTYLNPFIG	420
	:. :*. * . * * * *:*****.:*:***.***** ***. **	
<i>H. pylori</i>	YEKSAMIAKEALKSDRSIYDIALEKKILTKEQLDDIFKPENMLSP-HAFKKHKD----	468
<i>E. coli</i>	HHNGDIVGKICAEETGKSVREVLERGLLEAELDDIFSVQNLMPAYKAKRYTDESEQ	478
	:.. :.* . :.:*: :.***: ***: *****. *:.* : * : * :.* *	

Figure 43 Alignement des protéines AspA de *H. pylori* et de *E. coli*.

Séquence issue de la souche B128 de *H. pylori* (Farnbacher *et al*, 2010) et de la souche SMS-3-5 de *E. coli* (Fricke *et al*, 2008). Les étoiles indiquent les résidus conservés, les doubles points les substitutions synonymes et les points les substitutions non-synonymes. La région surlignée en jaune correspond au domaine 2 de la protéine impliqué dans la multimérisation. Alignement réalisé par ClustalW2.

AspA interagit aussi avec GdhA, uniquement dans la combinaison AspA_T18 + T25_GdhA, avec une valeur proche du seuil de positivité. Ceci indique que l'interaction entre AspA et GdhA est dépendante des domaines N_{ter} de AspA et du domaine C_{ter} de GdhA. De plus, l'activité β -galactosidase détectée pour cette interaction est faible, ce qui suppose que l'interaction est transitoire, ou de faible affinité. Enfin, nous notons que cette interaction ne s'établissant pas dans un schéma favorable à la multimérisation de AspA, elle peut être indépendante du degré de multimérisation des deux partenaires.

La protéine GlnA est celle qui s'avère avoir le plus de partenaires. Premièrement, GlnA interagit avec elle-même dans toutes les configurations testées. Les activités β -galactosidase associées à cette interaction sont les plus fortes détectées dans cette étude, signant une interaction stable. La structure de la glutamine synthétase de *Salmonella typhimurium* a révélé une organisation dodécamérique de l'enzyme organisée en deux anneaux superposés de 6 sous-unités chacun, formant un tunnel dans lequel sont exposés les sites catalytiques. Les deux anneaux sont maintenus entre eux grâce aux extrémités C_{ter} des sous-unités (Yamashita *et al*, 1989). Chez *H. pylori*, il n'a jamais été possible d'étiqueter la glutamine synthétase (Stingl *et al*, 2008). On ne peut pas exclure que les protéines de fusion forment un complexe hétéromérique avec des sous-unités de la glutamine synthétase de la souche réceptrice de *E. coli* qui serviraient d'adaptateur, expliquant les fortes interactions détectées. Il est probable que la fusion d'une étiquette à la protéine GlnA inactive la protéine en déstabilisant sa multimérisation. On peut donc supposer que le multimère hybride qui se forme dans la souche réceptrice de *E. coli* est inactif.

En second lieu, GlnA est capable d'interagir avec UreA, comme cela avait déjà été détecté dans une étude précédente en TAP (Stingl *et al*, 2008). Cette interaction est visible dans la majorité des conditions, avec des activités β -galactosidase associées clairement positives. L'interaction est optimale lorsque GlnA est étiquetée en N_{ter} et UreA en C_{ter}. L'homomultimérisation de UreA n'ayant lieu que dans le cas où UreA est fusionnée par son extrémité C_{ter}, ceci indique que l'interaction de UreA avec GlnA pourrait être favorisée par la multimérisation de UreA.

GlnA interagit avec AspA uniquement quand AspA est fusionnée en N_{ter}, indiquant vraisemblablement que l'interaction entre GlnA et AspA s'établit par le domaine C_{ter} de AspA. Une autre explication serait que l'interaction est dépendante de la multimérisation de AspA, qui est favorisée dans ces conditions.

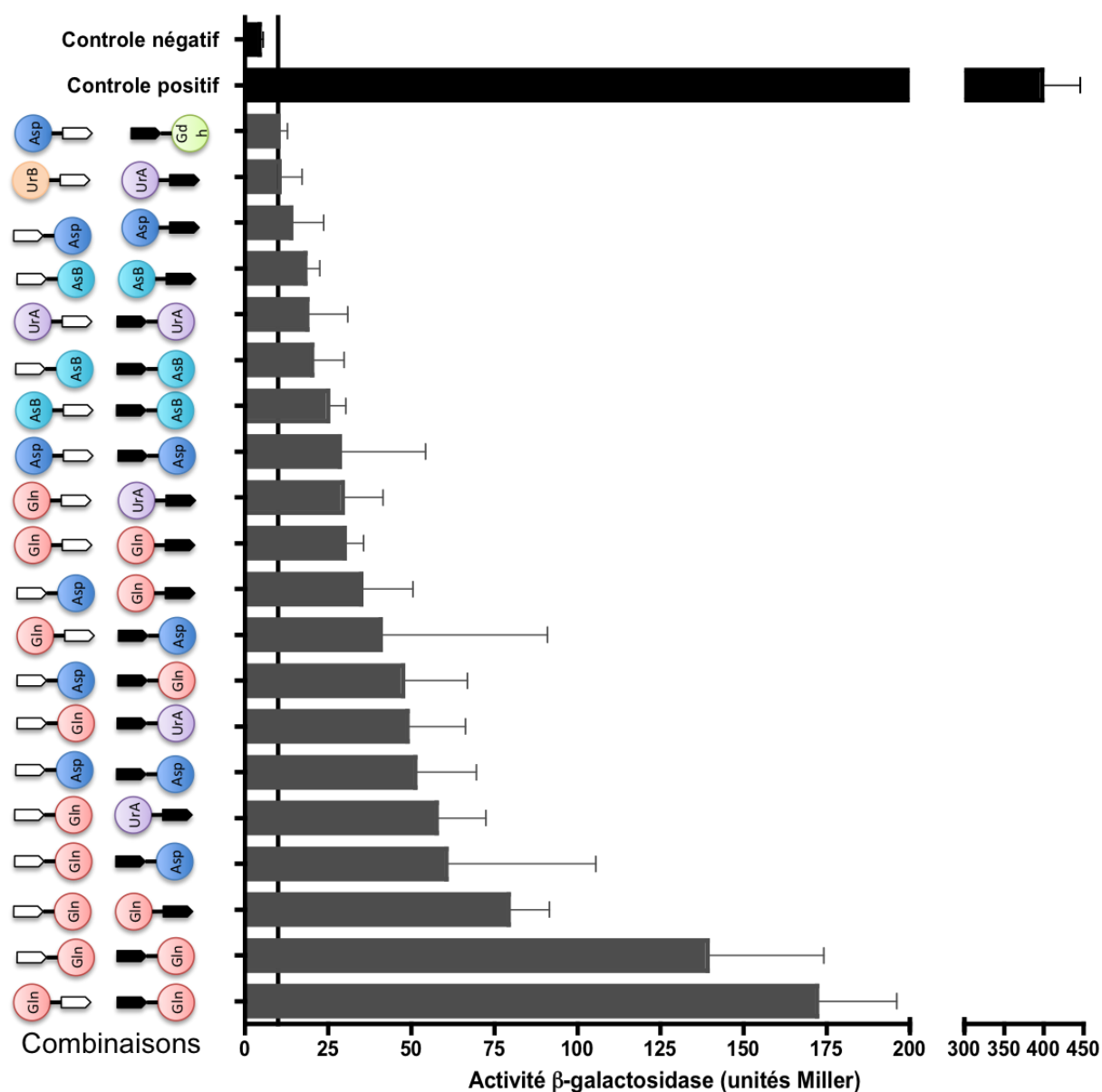


Figure 44 Quantification de l'activité β -galactosidase des expériences de complémentation fonctionnelle positives

Les valeurs d'activités des couples appât / proie dont le niveau est inférieur au seuil de positivité ne sont pas montrées sur ce graphique. La barre verticale en trait plein noir correspond au seuil de positivité.

La figure 45 résume les interactions identifiées entre les différentes protéines et explicite les domaines par lesquels l'interaction des protéines semble se produire. Le réseau d'interactions retracé montre un rôle central de GlnA, avec deux partenaires UreA et AspA. UreA et AspA interagissent chacun avec un partenaire supplémentaire tandis que AspB ne prend pas part au réseau.

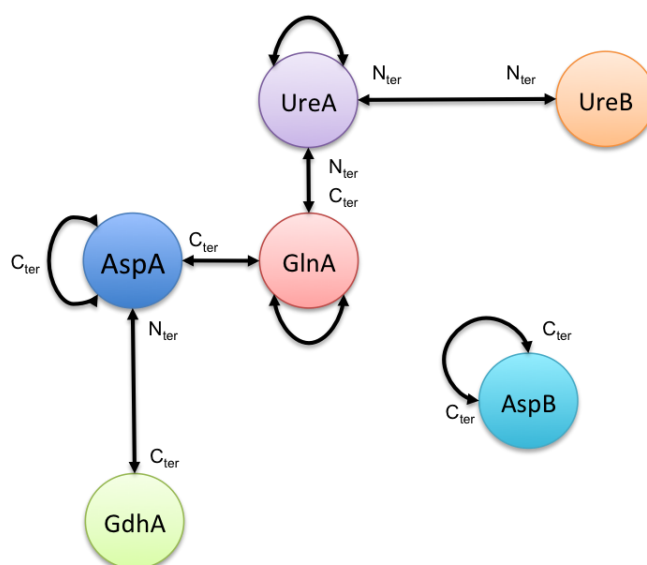


Figure 45 Schéma récapitulatif des interactions au sein des protéines testées

4. Discussion

Nous avons mené par double hybride une étude ciblée afin d'identifier les interactions s'établissant entre les protéines du métabolisme de l'ammoniac. Cette étude confirme un certain nombre d'interactions déjà documentées impliquant l'uréase, ainsi que de nouvelles interactions entre enzymes productrices d'ammoniac et enzymes ayant l'ammoniac comme substrat (Rain *et al*, 2001; Stingl *et al*, 2008).

De manière surprenante, certaines interactions bien documentées ne sont pas retrouvées. Ce sont par exemple les interactions entre UreA et UreB, ou la multimérisation de UreA, associées à des activités β -galactosidase faibles dans notre étude. Le système du BACTH repose sur la surexpression des protéines appât et proie. Cependant, les plasmides permettant la fusion de l'appât avec T18 sont présents en haut nombre de copies dans la cellule, tandis que ceux permettant la fusion avec T25 le sont en faible nombre, induisant *de facto* une différence dans l'abondance relative des deux protéines testées. La faible interaction entre UreA et UreB, ou d'UreA avec elle-même, est peut-être due à la modification de la stœchiométrie des partenaires. Sachant que ces interactions sont trouvées en TAP, nous pouvons aussi former l'hypothèse que ces interactions nécessitent *in vivo* l'action d'un troisième partenaire, absent chez *E. coli*, comme les protéines de maturation de l'uréase. Cependant, en TAP, il a été montré que la protéine UreA fusionnée à l'étiquette TAP était responsable d'une diminution de l'activité uréasique (Stingl *et al*, 2008). Une raison invoquée est que l'étiquette perturberait la multimérisation de UreA. Dans notre étude, UreB n'est pas retrouvé comme interagissant avec

lui-même. Il se peut donc que la formation du complexe UreAB soit désavantagée par la faible interaction UreA/UreA et l'absence d'interaction UreB/UreB.

Nous avons mis en lumière des interactions qui s'établissent entre enzymes productrices d'ammoniac (UreA, AspA) et les enzymes consommatrices d'ammoniac (GlnA, GdhA). Nous postulons que consommateur et producteur établissent un partenariat afin d'optimiser la biodisponibilité de l'ammoniac, le produit d'une réaction servant de substrat à une autre. L'ammoniac serait alors l'objet d'un *channeling* métabolique favorisant l'activité des enzymes, ou régulant l'activité par limitation de leur substrat.

Le *channeling* des substrats est une notion ancienne et pertinente pour expliquer le fonctionnement des complexes multienzymatiques (Srere, 1987). Les couplages fonctionnels entre enzymes ont été bien étudiés, mais les études démontrant clairement le *channeling* d'un composé sont rares.

Le premier exemple décrit concerne la carbamoyl-phosphate synthétase de *E. coli*. Cette enzyme catalyse la formation du carbamoyl-phosphate à partir du bicarbonate, de glutamine et d'ATP. Elle est constituée de deux centres catalytiques espacés de 45 Å l'un de l'autre. L'hydrolyse de la glutamine par la carbamoyl-phosphate synthétase libère de l'ammoniac qui va être fixé sur le carboxyphosphate, intermédiaire réactionnel, pour former du carbamate, qui sera à son tour phosphorylé pour former le carbamoyl-phosphate. Se basant sur des études enzymatiques démontrant que la réaction fonctionne sans déperdition d'ammoniac, et sur la base de leurs structures cristallographiques, les auteurs proposent que l'ammoniac soit *tunnelé* de manière dirigée d'un site catalytique à l'autre, afin d'optimiser la réaction (Thoden *et al*, 1997).

Un autre exemple de *channeling* de l'ammoniac concerne le complexe de transamidation de *S. aureus*. Il a été modélisé par cristallographie un tunnel physique entre le site d'activité glutaminase et le site de transamidation du complexe GatCAB (Nakamura *et al*, 2006).

Il est intéressant de noter que dans ces deux exemples, comme dans notre étude, le composé faisant l'objet du *channeling* est l'ammoniac. A ce jour aucun exemple de tunnel physique entre deux complexes enzymatiques n'a été démontré pour un autre composé.

Ainsi, la glutamine synthétase, GlnA, établissant des interactions avec UreA et AspA, verrait son activité optimisée par augmentation de la biodisponibilité du substrat en cas d'hydrolyse de l'urée ou de l'aspartate. En effet, la glutamine synthétase de *H. pylori* ne possède pas le motif classique pour la régulation de son activité, et sa surexpression chez *E. coli* devrait

s'avérer toxique en absence de supplémentation du milieu en glutamate, à moins que celle-ci ne fonctionne qu'en interaction avec ses partenaires.

Selon les mêmes modalités, l'interaction entre AspA et GdhA optimiserait le relargage d'une molécule d'ammoniac suite à l'hydrolyse de l'aspartate pour former du glutamate par fixation de cette molécule d'ammoniac sur une molécule de 2-oxoglutarate.

Le pK_a de l'ammoniac est de 9,2 en milieu aqueux ; par conséquent, à pH physiologique, une large partie de la population va être sous forme ionisée. Cependant, l'ammoniac est une molécule diffusible. L'ammoniac, bien que synthétisé en grandes quantités dans la cellule, pourrait donc être diffusible et difficilement accessible aux enzymes, d'où l'intervention de complexes protéiques permettant le *channeling* de l'ammoniac.

Nous avons donc mis en évidence trois couples d'interaction qui concourent à la synthèse de la glutamine, par synthèse optimisée des substrats de GlnA, ammoniac et glutamate (Figure 46). Le fait que le système soit dirigé vers la synthèse de la glutamine tend à démontrer que la fixation de l'ammoniac synthétisé sur le glutamate pourrait permettre la détoxification du cytoplasme. Cependant, une concentration intracellulaire élevée de cette molécule pourrait s'avérer délétère.

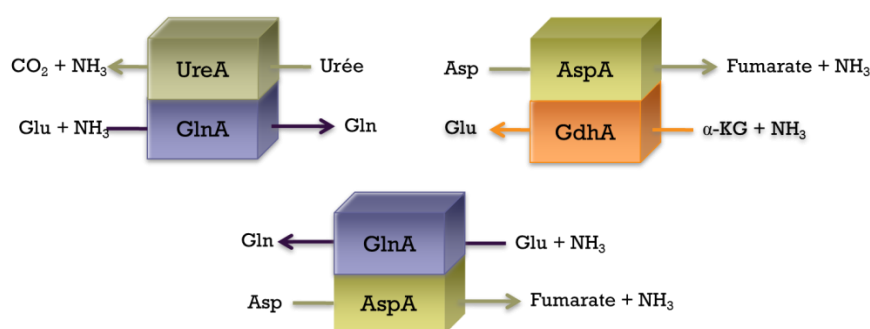


Figure 46 Résumé des interactions trouvées dans notre étude et mettant en jeu un *channeling* de l'ammoniac

H. pylori subit donc une importante pression pour optimiser l'activité de GlnA, aux fins de former de la glutamine. La glutamine étant tout à la fois substrat de nombreuses réactions, donneur d'ammoniac, et d'une certaine manière forme de stockage de celui-ci.

Discussion et Perspectives

Chapitre I. Réseaux d'interactions protéiques dans le métabolisme de l'ammoniac : régulation, optimisation et virulence

I. Introduction

Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence deux systèmes d'hydrolyse de la glutamine et de l'asparagine, couplés au transport du glutamate et de l'aspartate. Chacun des composants du système est essentiel à la colonisation du modèle animal. Par ailleurs, notre étude menée en BACTH sur les protéines du métabolisme de l'ammoniac indique l'existence de complexes protéiques optimisés permettant un *channeling* métabolique de ce composé entre enzymes productrices et enzymes consommatrices d'ammoniac.

L'ammoniac tient une place particulière chez *H. pylori* : composé associé à la défense contre l'acidité, sa production en grande quantité au contact de l'épithélium gastrique par les systèmes originaux que nous avons découverts pourrait participer à la pathogenèse. Cette production issue de l'hydrolyse de la glutamine et de l'asparagine pourrait s'accompagner d'une déplétion locale en acides aminés.

La production d'ammoniac a lieu au sein de complexes protéiques régulés à plusieurs niveaux : pH, concentration en nickel, acidité.

2. Régulation des complexes producteurs d'ammoniac

La régulation des complexes protéiques peut intervenir à différents niveaux : transcriptionnel, traductionnel ou fonctionnel. Nous avons montré une activité optimale des couples γ GT/GltS et AnsB/DcuA à pH neutre tandis que leur transcription n'est pas régulée par le pH. Ces données suggèrent fortement que le métabolisme de l'asparagine et de la glutamine est indépendant de la résistance à l'acidité.

Dans sa niche, *H. pylori* subit un apport constant d'acides aminés provenant du bol alimentaire. *H. pylori* consomme de fortes concentrations d'acides aminés parmi lesquels l'asparagine et la glutamine, ainsi que leurs acides respectifs, sont majoritaires (Reynolds & Penn, 1994; Stark *et al*, 1997). Ces acides aminés peuvent servir de sources de carbone et d'azote. Il a été rapporté que la glutamine synthétase voit son taux de transcription diminué par l'acidité (Wen *et al*, 2003). A l'inverse, AspA et GdhA sont transcriptionnellement activés par l'acidité (Wen *et al*, 2003; Merrell *et al*, 2003). En termes de régulation pH dépendante des complexes, il se dessine donc un mécanisme où une production d'ammoniac aurait lieu dans le cytoplasme par AspA tandis que GdhA dirigerait le métabolisme vers la synthèse de glutamate. En revanche, à pH acide, la synthèse de glutamine dépendant de GlnA serait restreinte, diminuant la consommation d'ammoniac indispensable à la résistance à l'acidité.

A l'inverse, l'uréase est positivement régulée par l'acidité, tant au niveau transcriptionnel, qu'au niveau fonctionnel avec l'ouverture du canal à urée Urel (Bury-Moné *et al*, 2001, 2004). La production d'ammoniac est donc maximale à bas pH. Dans ces conditions, le nickel est plus soluble et le taux de transcription de l'uréase est de plus régulé positivement par NikR (Muller *et al*, 2011). A pH acide, l'ammoniac produit par l'uréase va servir de composé tampon. En revanche, à pH neutre, il constitue une source d'azote pour le métabolisme. *H. pylori* a des quantités massives d'ammoniac à gérer. Pour éviter la toxicité de celui-ci, il va être stocké dans la glutamine au travers d'un couplage métabolique entre l'uréase et la glutamine synthétase. La glutamine servira ensuite de donneur d'ammoniac dans les processus cellulaires.

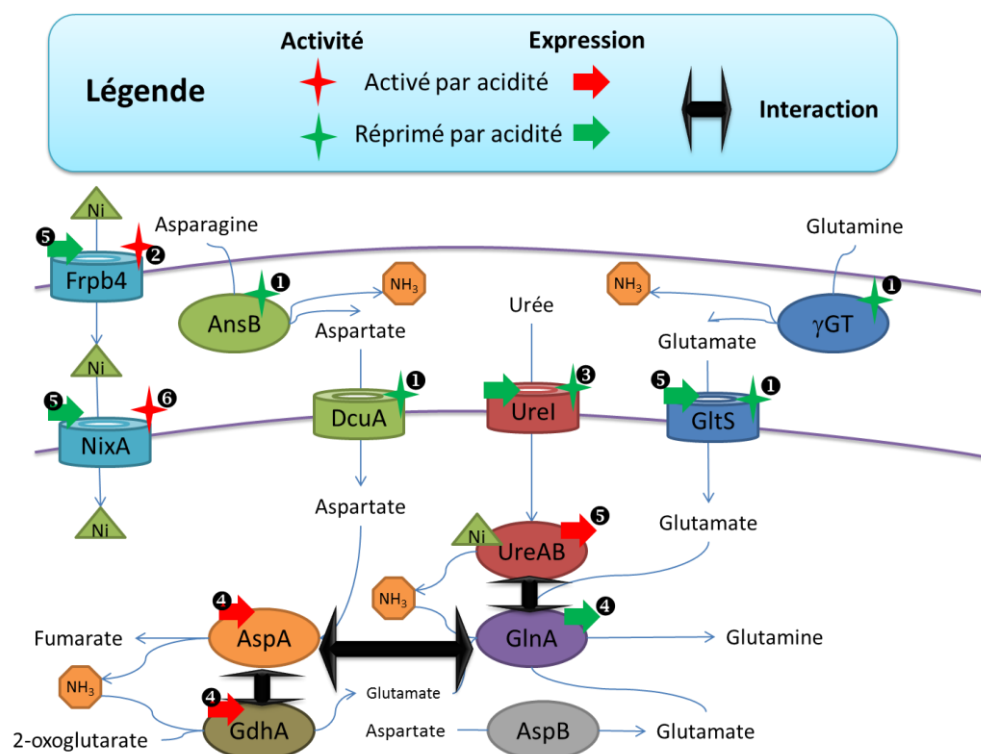


Figure 47 Régulation des complexes producteurs d'ammoniac

Références : ❶, (Leduc *et al*, 2010) ; ❷, (Schauer *et al*, 2007) ; ❸, (Bury-Moné *et al*, 2001) ; ❹, (Wen *et al*, 2003) ; ❺, (Bury-Moné *et al*, 2004)

3. Le métabolisme de l'asparagine et de la glutamine : tourné vers la virulence ?

Dans les conditions d'une infection établie au sein du mucus gastrique, le pH est très modérément acide, et au contact des cellules épithéliales, *H. pylori* rencontre un pH neutre. Comme nous l'avons montré, les couples AnsB/DcuA et γ GT/GltS fonctionnent de manière optimale à pH neutre. Toutefois, AnsB et γ GT atteignent 90% de leur activité maximale à pH 6. La consommation d'asparagine et de glutamine, et la production d'ammoniac associée ont donc très probablement lieu à la fois au contact des cellules épithéliales et dans les zones muqueuses proches.

De plus, au contact des cellules épithéliales, grâce à l'action des toxines VacA et CagA, on assiste à un afflux de nutriments provenant de l'épithélium endommagé. On peut supposer que l'urée, molécule issue de sang, devient alors accessible à la bactérie. Or, dans ces conditions, l'ouverture de Urel dépendante de l'acidité n'est plus nécessaire au passage transmembranaire d'une partie de l'urée (Skouloubris *et al*, 1998). On peut donc préjuger que dans ces conditions l'uréase présente un niveau d'activité basal (Figure 48).

que dans la cellule, l'ammoniac est détoxifié sous forme de glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine accumulée est alors transportée vers la mitochondrie où elle est dégradée en ammoniac, responsable de la perméabilisation membranaire de la mitochondrie (Albrecht *et al*, 2010). Il a été montré que l'estomac présente l'activité glutamine synthétase la plus élevée du tractus digestif (Lie-Venema *et al*, 1997; James *et al*, 1998). Nous proposons donc un détournement du métabolisme des acides aminés pour la réponse pathogénique de *H. pylori* qui serait potentialisée par la production d'ammoniac, conjointement à la déplétion en glutamine de l'épithélium gastrique.

Les mécanismes de détournement des fonctions de l'hôte par les bactéries à des fins de pathogénèse sont bien connus. Ainsi on peut citer la capture du fer à partir de la transferrine humaine chez *Neisseria gonorrhoeae* ou la dissémination de *Shigella flexneri* au travers des entérocytes par mobilisation de l'actine de l'hôte (Siburt *et al*, 2009; Fukumatsu *et al*, 2012). Chez *H. pylori*, un autre mécanisme reposant sur le détournement du métabolisme des acides aminés participant à la virulence a été rapporté. En effet, les macrophages peuvent générer du NO, toxique pour *H. pylori*. *H. pylori* échappe à la production de NO en induisant la transcription de l'arginase dans les macrophages. L'augmentation de la concentration de l'arginase dans les macrophages cause une déplétion du pool cellulaire d'arginine. L'arginine est un précurseur de NO, substrat de la NO synthétase. Par compétition pour l'arginine, la génération de NO sera donc atténuée et échoue à tuer *H. pylori* (Lewis *et al*, 2011). L'arginase de *H. pylori* participe également à la déplétion de l'arginine dans le microenvironnement épithélial (Gobert *et al*, 2001). Les parasites *Leishmania major* et *Trypanosoma cruzi* mettent en place un mécanisme similaire de survie dans les macrophages par production d'une arginase qui entre en compétition pour l'arginine avec la NO synthétase.

4. Perspectives

L'hypothèse du *channeling* de l'ammoniac dans les complexes protéiques chez *H. pylori* pourra être testée à différents niveaux. Tout d'abord, il sera intéressant de tenter de cocrystalliser les complexes AspA/GdhA et AspA/GlnA afin d'investiguer l'existence de tunnels moléculaires de guidage de l'ammoniac dans ces deux systèmes. On peut aussi chercher à démontrer l'optimisation du transfert de l'ammoniac quand les protéines agissent en complexe. Après purification individuelle des protéines, par des techniques enzymologiques, il sera intéressant de calculer la vitesse des réactions enzymatiques selon que les protéines sont seules, ou avec leur partenaire producteur d'ammoniac.

Chez *H. pylori* nous avons initié une étude systématique par TAP des enzymes du métabolisme de l'ammoniac. En utilisant AspA et GdhA comme appât, en conditions natives ou *crosslinkées* nous n'avons pas identifié de partenaires. Notre interprétation est que les complexes impliquant AspA et GdhA se forment de façon transitoire. Le BACTH est donc une meilleure méthode pour étudier ces complexes. Nous souhaitons caractériser plus précisément les complexes en identifiant des mutants qui abolissent l'interaction, ou au contraire en rajoutant les substrats des différentes enzymes. Nous pensons que les substrats pourraient stabiliser les complexes et ainsi renforcer l'interaction entre les partenaires.

L'étude de la pathogenèse chez *H. pylori* est fortement centrée sur VacA et CagA, identifiés comme des effecteurs centraux de la virulence. Si VacA et CagA sont bien responsables de phénotypes très marqués et sont corrélés à des infections débouchant sur des pathologies plus sévères, l'étude du métabolisme de la bactérie en tant qu'effecteur de la virulence s'est révélée très intéressante (Wen & Moss, 2009).

Nous savons que les différents partenaires des systèmes d'hydrolyse/transport des acides aminés que nous avons identifiés sont essentiels à la colonisation du modèle animal, tout comme la glutamine synthétase (Stingl *et al*, 2008; Leduc *et al*, 2010). De plus, entre nos mains, il n'a jamais été possible de réaliser un mutant de AspB chez *H. pylori*, démontrant probablement l'essentialité de cette protéine. Plusieurs voies peuvent cependant être suivies pour caractériser le rôle des complexes protéiques impliqués dans le métabolisme de l'ammoniac dans la pathogenèse.

Tout d'abord, il paraît intéressant de connaître la part respective de chaque complexe dans la génération d'ammoniac au contact des cellules épithéliales. On pourrait suivre l'élévation locale du pH à proximité des cellules gastriques en culture infectées avec *H. pylori*. Cette étude pourrait se faire avec des mutants des complexes testés, ou, à défaut de pouvoir effectuer les mutations, en apportant ou retirant les précurseurs de la synthèse d'ammoniac. Une technique que l'on pourrait utiliser repose sur la microscopie à prise d'image rapide en présence d'un milieu répondant de manière colorimétrique aux changements de pH, ou par ajout de marqueurs fluorescents répondant au pH (Athmann *et al*, 2000; Fricker *et al*, 2008). Les images pourraient ensuite être caractérisées et quantifiées informatiquement pour corréler fluorescence et changement de conditions environnementales.

Finalement, et selon les mêmes modalités, la réponse cellulaire à l'infection pourrait être mesurée pour l'apoptose ou l'inflammation. Ces observations pourraient être réalisées en direct par fusion transcriptionnelle avec un rapporteur fluorescent des gènes de l'hôte dont

l'expression est augmentée en présence de l'infection. Les gènes des caspases 8 et 3 ou de l'IL-8 sont de bons candidats (Ashktorab *et al*, 2002; Eftang *et al*, 2012).

Chapitre 2. Dépendance de *H. pylori* au nickel : une stratégie risquée et payante

I. *Helicobacter pylori*, métallo-adapté à sa niche ?

La colonisation et la survie de *H. pylori* dans sa niche sont très fortement dépendantes du nickel. Faiblement présent dans les êtres vivants, ce métal est apporté en petite quantité dans le bol alimentaire *via* les fruits secs et certaines céréales par exemple. *H. pylori* possède des systèmes sophistiqués de captation du nickel. Cette avidité pour le nickel n'est pas sans danger et les mécanismes d'importation, de stockage, d'incorporation et d'export du nickel doivent être finement régulés pour permettre un apport suffisant, mais aussi pour se prémunir contre les effets délétères du nickel, potentiellement toxique.

I.1 Avide ou fin gestionnaire ?

I.1.1. Les protéines fixatrices de nickel : inédites et multifonctionnelles

H. pylori contient 50 fois plus de nickel que *E. coli* (Schauer, 2007). La gestion d'un tel stock de nickel nécessite des mécanismes de résistance inédits. Les protéines comme HspA et son extension particulière à *H. pylori*, *H. ceterum* et *H. acinonychis*, conjointement à Hpn et Hpn-2, représentent un des premiers exemples de protéines bactériennes dont la richesse en histidine ne laisse aucun doute sur leur capacité à fixer le nickel. Le travail réalisé dans cette

thèse, ainsi que l'étude de *Schauer et al.* ont démontré le rôle de ces protéines dans la résistance aux concentrations élevées en nickel, et certains autres métaux (*Schauer et al*, 2010). Il est probable que les métaux exercent des effets plus délétères quand ils sont à l'état non séquestré, et à ce titre, la capacité de fixation de Hpn et Hpn-2 peut être vue comme un mécanisme de défense passif contre les excès de nickel. Nous pouvons nous interroger sur la fonction véritable de ces protéines : leur rôle est-il seulement de séquestrer le nickel ou peuvent-elles aussi le mettre en réserve et le stocker pour le distribuer ensuite ?

Nos résultats indiquent que le rôle de ces protéines n'est pas restreint au stockage du nickel. En effet, Hpn et Hpn-2 se comportent comme de véritables plateformes de distribution spécifiques à l'uréase. Le fonctionnement de l'uréase est donc subordonné à l'abondance en nickel, mais aussi au chargement des protéines fixatrices avec le nickel.

Dans des conditions de concentration faible en nickel, l'accès des différentes protéines fixant le nickel et la hiérarchie avec laquelle elles interviennent pour fixer le métal reste à élucider. De plus, les mécanismes qui permettent l'accès des protéines accessoires de l'hydrogénase et de l'uréase au nickel fixé sur les protéines de séquestration sont inconnus.

Nous avons montré qu'en conditions limitantes en nickel, Hpn-2 réprime l'activité uréasique. Nous avons aussi observé que les effets de Hpn et Hpn-2 se manifestent à quantité d'uréase constante. Par conséquent, les effets de Hpn-2 s'exercent par une limitation de l'accès de l'uréase au nickel. *In vitro*, le K_d des protéines fixatrices de nickel chez *H. pylori* est assez similaire variant de 2 μM pour HspA à 3,8 μM pour Hpn-2 et 7,1 μM pour Hpn (*Zeng et al*, 2008). L'affinité de l'uréase ou de l'hydrogénase pour le nickel n'est pas connue. Chez *H. pylori*, le K_d pour le nickel de UreE, une des protéines accessoires de l'uréase est de 10 μM , révélant une affinité plus forte de Hpn et Hpn-2 pour le nickel (*Grossoehme et al*, 2007). Cependant, ces K_d calculés *in vitro* ne reflètent pas nécessairement la situation à l'intérieur la bactérie. Chez *H. pylori*, UreE ne fixe qu'un seul ion nickel par monomère de protéine. Comparé à la protéine UreE de *K. aerogenes*, UreE de *H. pylori* est déficient dans le domaine C_{ter} fixant le nickel riche en histidine. On peut faire l'hypothèse que chez *H. pylori*, UreE pourrait donc être dépendant des protéines fixant le nickel comme Hpn ou Hpn-2 pour être efficace.

Il demeure encore beaucoup d'inconnues dans la manière dont se déroule la distribution du nickel et son insertion dans l'uréase et l'hydrogénase de *H. pylori*. Nos résultats suggèrent que les protéines fixatrices de nickel agissent en réseau plutôt qu'individuellement. Ce processus ne servirait pas à stocker le nickel passivement dans les protéines mais à le guider vers les protéines d'intérêt en réponse aux variations des conditions du milieu.

Un autre élément intrigant consiste en l'extension riche en glutamine de Hpn-2. Comme nous l'avons démontré, la glutamine n'est pas importée chez *H. pylori* (Leduc *et al*, 2010). Notre laboratoire a depuis longtemps émis l'hypothèse que la glutamine pourrait permettre un stockage de l'ammoniac produit en grandes quantités chez *H. pylori*, par amidation du glutamate. Nous avons observé qu'en présence de nickel, la protéine Hpn-2 agit comme un répresseur de l'accumulation intracellulaire de ce métal, et donc comme un répresseur de l'uréase. Nous postulons donc que la protéine Hpn-2 pourrait servir de réservoir de glutamine dans les conditions où la synthèse d'ammoniac est abondante. Polymérisée dans une protéine, la glutamine ne perturberait pas le métabolisme cellulaire.

1.1.2. Réseaux de régulation des protéines fixatrices de nickel

Les protéines de fixation du nickel Hpn et Hpn-2 sont régulées positivement par le nickel *via* NikR. Cependant, cette induction ne suit pas immédiatement l'exposition au nickel. L'uréase voit son taux de transcrit augmenté de 10 fois dès 30 minutes d'exposition au nickel, alors que les transcrits de *hpn* et *hpn-2* ne répondent qu'après 1 heure d'exposition, pour un taux de synthèse augmenté de 2 fois. Ce taux atteint 5 fois à 5 heures d'exposition (Muller *et al*, 2011). Au vu de ces résultats, Hpn, Hpn-2 et HspA apparaissent comme des réservoirs à nickel induits en cas d'exposition prolongée. Nos résultats ont démontré la nécessité de Hpn et Hpn-2 dans l'activation optimale de l'uréase. Nous proposons le modèle suivant : il y aurait synthèse précoce du *pool* d'uréase en présence de nickel, tandis que les protéines Hpn et Hpn-2 seraient synthétisées plus tardivement et permettraient la régulation du chargement du *pool* d'uréase néoformé. Nous pouvons imaginer une situation où le *pool* d'uréase est maximal, mais non chargé en nickel, comme proposé par Stingl & De Reuse, tandis que Hpn et Hpn-2 sont chargés avec du nickel (Stingl & De Reuse, 2005). Il est connu que l'acidité augmente la solubilisation du nickel. En conditions de stress acide, le nickel serait alors relargué et accessible aux protéines accessoires de l'uréase qui chargeraient alors l'enzyme en nickel. Une telle stratégie, où Hpn-2 réprimerait la fixation du nickel en conditions limitantes, permettrait alors une réponse d'urgence, une fois que les stocks de nickel ont été constitués.

Quand *H. pylori* est ingéré, la bactérie se retrouve dans la lumière gastrique extrêmement acide. Pour survivre à pH acide, *H. pylori* doit donc immédiatement mettre en place la réponse d'urgence à l'acidité *via* l'uréase. Les protéines Hpn et Hpn-2, chargées en nickel, pourraient alors être transmises pour moitié au moment de la division cellulaire afin que les cellules filles soient capables de répondre immédiatement aux conditions de stress de la niche, sans avoir

besoin de constituer leurs propres stocks de nickel. Hpn et Hpn-2 seraient alors un vecteur du nickel.

1.2 Modèle intégré du contrôle de l'homéostasie du nickel chez *H. pylori*

L'uréase de *H. pylori* est la plus active des uréases décrites à ce jour. Sa capacité à produire de l'ammoniac est bien supérieure à celle nécessaire pour maintenir le pH cytoplasmique de la bactérie autour de 7. Notre laboratoire a montré une interaction entre l'uréase et la glutamine synthétase. Nous avons postulé qu'une telle interaction aurait pour but d'optimiser la synthèse de glutamine en dirigeant le flux important d'ammoniac vers la glutamine synthétase. Nous avons fait l'hypothèse que la glutamine servirait de forme de stockage intracellulaire de l'ammoniac. Cependant, au risque de perturber la physiologie cellulaire, la concentration intracellulaire en glutamine doit être contrôlée. Nous faisons donc l'hypothèse que Hpn-2 existe sous deux formes. Une forme tronquée quand le *pool* intracellulaire de glutamine est faible et une forme totale, avec une extension C_{ter} riche en glutamine, quand le *pool* de glutamine est suffisant pour synthétiser la protéine entière. Hpn-2 permettrait donc le stockage de la glutamine pour éviter que celle-ci ne devienne toxique quand elle est en grande concentration dans le cytoplasme.

Nos résultats indiquent que l'extension riche en glutamine est nécessaire au contrôle du nickel intracellulaire. Cependant, cette extension n'est pas nécessaire au contrôle de l'activité uréasique. Nous pouvons donc imaginer un mécanisme où Hpn-2 serait synthétisé de façon tronquée, ne remplissant pas son rôle de contrôle du nickel intracellulaire, mais fixant le nickel importé, pour limiter l'activité de l'uréase. Quand suffisamment de nickel a été importé pour saturer Hpn-2, on peut avoir fixation du nickel sur Hpn. Hpn serait alors capable d'activer l'uréase. Une fois l'uréase activée, on a synthèse d'ammoniac, dont une partie est dirigée et sert de substrat à la glutamine synthétase. Il peut alors y avoir traduction de la protéine Hpn-2 totale dont l'extension C_{ter} riche en glutamine permet à la protéine d'exercer un contrôle de la concentration en nickel intracellulaire. En permettant le maintien de l'homéostasie du nickel, Hpn-2 évite ainsi que l'uréase soit trop largement chargée avec du nickel et que son activité trop forte n'entraîne une alcalinisation du cytoplasme. Enfin, en limitant la concentration intracellulaire en nickel, Hpn-2 permet aussi d'éviter les effets toxiques du nickel à haute concentration.

Le contrôle de l'homéostasie du nickel s'exerce selon plusieurs conditions chez *H. pylori*, que nous avons considéré précédemment. Premièrement, des conditions pauvres en nickel,

menant à un faible chargement de l'uréase. Deuxièmement, des conditions d'abondance du nickel, sans que la réponse de l'uréase à l'acidité ne soit requise. Troisièmement, les conditions où le nickel doit être abondant afin de permettre à l'uréase de répondre à l'acidité. Ces trois conditions sont détaillées dans les figures 49 à 51. Ces modèles ne sauraient être exhaustifs. En effet, il existe de plus des effets pléiotropiques et temporellement hiérarchisés de NikR qui sont détaillés dans la partie bibliographique de ce travail (Muller *et al*, 2011). Ces modèles présentent de manière intégrée le rôle de trois acteurs majeurs du métabolisme du nickel : Hpn, Hpn-2 et l'uréase, le sous-jacent étant que NikR régule ses cibles en fonction de la concentration intracellulaire en nickel.

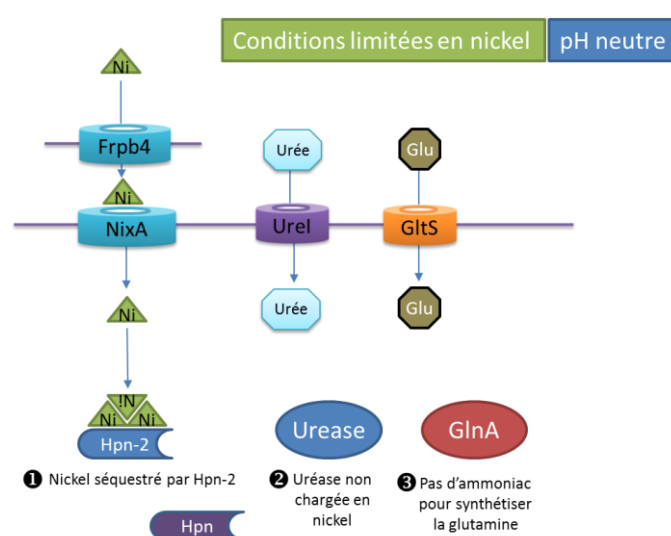


Figure 49 Modèle d'homéostasie du nickel en conditions de faible concentration en nickel dans le milieu extérieur

En conditions limitées en nickel, le transport du métal est activé tandis que les gènes de l'uréase, de Hpn et de Hpn-2 sont transcrits à un niveau basal. Le nickel capté est fixé par Hpn-2, qui limite sa fixation sur Hpn et donc, sur l'uréase. Celle-ci est faiblement active. On n'a pas de synthèse d'ammoniac, et donc, la glutamine n'est que peu formée dans la cellule, menant à la synthèse d'une protéine Hpn-2 tronquée qui ne permet pas le maintien de la concentration intracellulaire en nickel.

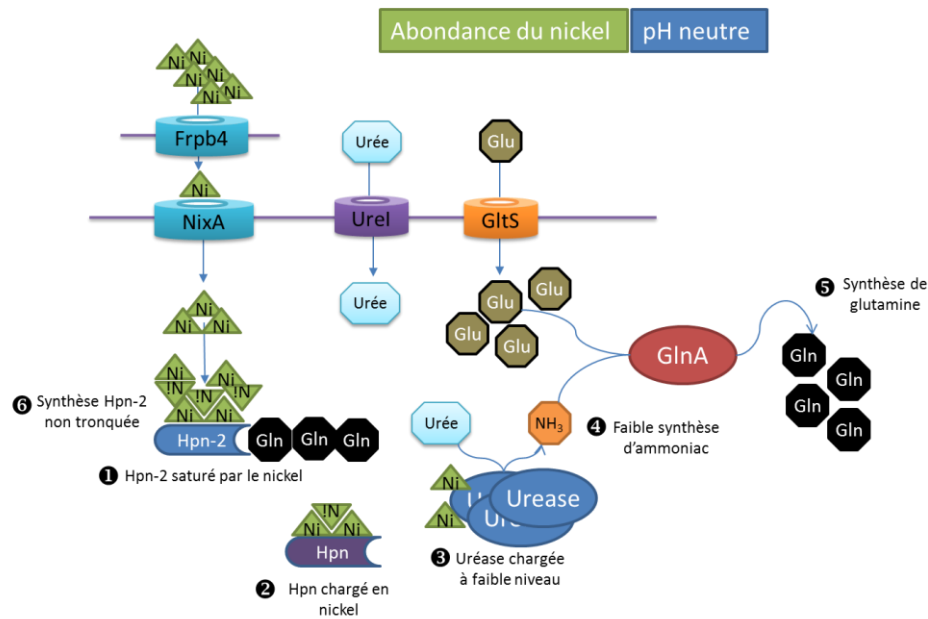


Figure 50 Modèle d'homéostasie du nickel en conditions non limitantes et pH neutre

En conditions non limitantes en nickel, celui-ci est importé dans la cellule puis fixé, premièrement par Hpn-2, puis quand la protéine est saturée, par Hpn. Le nickel lié à Hpn est transféré à l'uréase, dont la transcription des gènes est activée par le nickel. L'uréase chargée en nickel synthétise de l'ammoniac, en quantité limitée car en conditions de pH neutre, peu d'urée pénètre la cellule. L'ammoniac sert alors de substrat à la glutamine synthétase (GlnA) qui le fixe sur du glutamate, pénétrant dans la cellule à pH neutre *via* GltS. La glutamine permet la synthèse d'une protéine Hpn-2 entière, dont la région C_{ter} riche en glutamine permet le contrôle de la concentration intracellulaire en nickel.

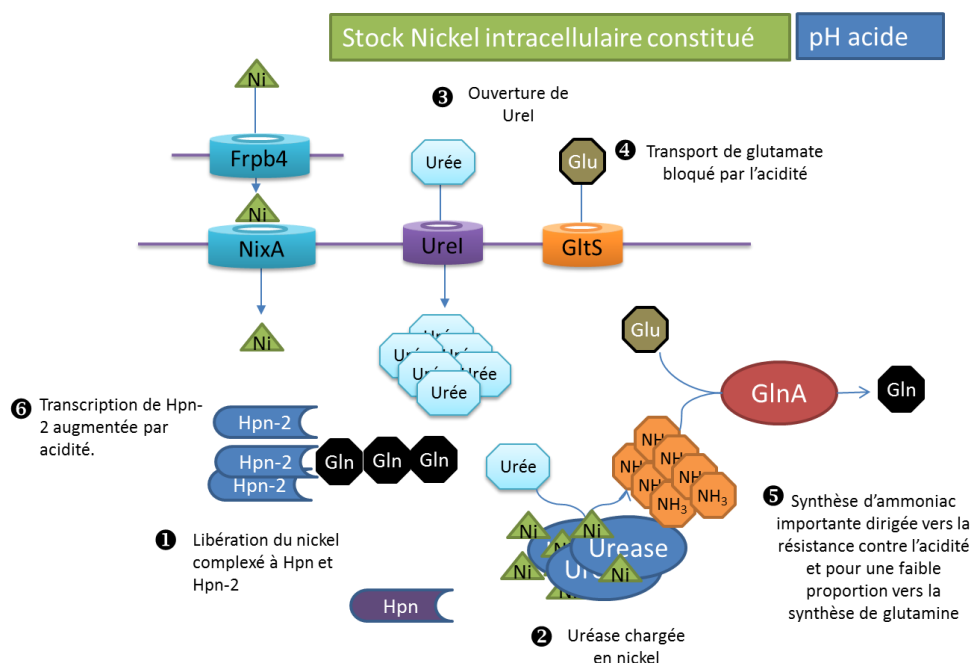


Figure 5I Mécanisme de contrôle du nickel intracellulaire à pH acide

Nous postulons que l'uréase ne peut répondre à l'acidité sans que le *pool* de nickel intracellulaire ne soit constitué. En condition acide, le nickel fixé sur Hpn et Hpn-2 permet un chargement maximal de l'uréase. Le canal à urée Urel s'ouvre tandis que le transporteur du glutamate GltS est fermé. L'uréase ayant un accès non limité à l'urée catalyse la synthèse de l'ammoniac afin de répondre à l'acidité. La synthèse de glutamine est limitée. Hpn-2 voit sa transcription augmentée par l'acidité, mais sa synthèse a lieu sous forme tronquée due à la limitation en glutamine. Cette forme de Hpn-2 ne permet pas le contrôle de l'activité uréasique et n'est pas efficace pour maintenir la concentration intracellulaire en nickel. Le nickel nouvellement importé se fixe donc sur Hpn-2, mais n'est pas stabilisé par la région C_{ter} riche en glutamine. Ce nickel est alors facilement accessible à l'uréase dont l'activité a besoin d'être maximale pour permettre la résistance à l'acidité.

1.3 Comparaison avec les mécanismes de résistance aux métaux chez les autres bactéries

Le mécanisme de maintien de l'homéostasie du nickel chez *H. pylori* est très complexe. Sans vouloir être exhaustif, voici quelques exemples de résistance aux stress métalliques mis en place par les bactéries. Chez *E. coli*, la résistance au nickel met en œuvre le régulateur transcriptionnel NikR, qui réprime l'expression du transporteur à nickel en présence du métal, et d'une pompe d'efflux, RcnA.

La protéine Hpn de *H. pylori* présente des analogies avec la ferritine en termes de détoxification d'un métal. Comme la ferritine, elle est abondante et forme des complexes de haut poids moléculaire *in vitro* permettant pour Hpn le stockage du nickel.

Des mécanismes originaux permettent chez certaines bactéries la résistance au cuivre ou à l'arsenic. Chez *E. coli*, la résistance au cuivre repose sur un senseur cytoplasmique CueR qui, en présence de cuivre, active la transcription d'une pompe d'efflux ATP dépendante, CopA, et d'une oxydase du cuivre périplasmique CueO. CopA chasse le cuivre du cytoplasme vers le périplasme tandis que CueO oxyde le Cu(I) très toxique, en Cu(II) moins toxique. Les concentrations élevées de cuivre dans le périplasme sont détectées par le système à deux composants CusRS, qui active en retour la transcription des gènes CusABS et CusF impliqués dans l'export du cuivre au travers de la membrane externe (Osman & Cavet, 2008).

Par analogie, la résistance aux concentrations élevées en arsenic a été bien étudiée chez *Corynebacterium glutamicum*, qui peut résister à des concentrations allant jusqu'à 300 mM d'As(V). Les mécanismes de résistance reposent sur les mêmes principes que pour le cuivre et mettent en œuvre un senseur, ArsR, une pompe d'efflux, ArsB et une oxydase cytoplasmique qui oxyde l'As(III) très toxique et affin pour les groupements thiols des protéines en As(V), moins toxique (Mateos *et al*, 2006). Enfin, de manière originale, certaines bactéries comme *Herminiimonas arsenicoxydans* secrètent un exopolymère qui permet à la communauté bactérienne de constituer un biofilm dans lequel l'arsenic est séquestré hors de la cellule (Lièvremonet *et al*, 2009).

Les bactéries ferromagnétiques forment un groupe hétérogène de bactéries qui ont la capacité de s'orienter en fonction des champs magnétiques. Pour ce faire, ces bactéries établissent dans leur cytoplasme des magnétosomes. Les magnétosomes sont des structures sphériques, organisés en chapelets attachés au cytosquelette, et contenant des espèces magnétiques du fer (magnétite, greigite, pyrite, *etc.*). Bien que d'une taille faible, de l'ordre de 30 nm, les cristaux magnétiques à l'intérieur des magnétosomes représentent une quantité de fer

non négligeable (Zhou *et al*, 2012). Pour se prémunir de la toxicité du fer, les bactéries ferromagnétiques enferment donc les cristaux à l'intérieur d'une membrane de type bicouche lipidique issue de l'invagination de la membrane interne. Ce mécanisme original de séquestration des métaux est spécifique à ces bactéries (Greene & Komeili, 2012).

La résistance au nickel chez *H. pylori* revêt un caractère inédit parmi les microorganismes. En effet, le mécanisme de résistance met en jeu non seulement un senseur cytoplasmique qui peut réguler l'accumulation intracellulaire du nickel, une pompe d'efflux peu spécifique CznABC qui expulse le nickel, mais aussi Hpn, Hpn-2 et HspA qui constituent des exemples uniques de protéines fixatrices de nickel. Comme nous l'avons montré, la concentration intracellulaire augmente parallèlement à l'augmentation de la concentration en nickel dans le milieu de culture. Nous pouvons donc conclure que CznABC est un système peu spécifique et probablement peu efficace. Les protéines Hpn, Hpn-2 et HspA sont à mettre en perspective avec la nécessité absolue du nickel chez *H. pylori* ainsi que la probable irrégularité des apports en nickel. Ainsi la bactérie stocke plutôt le nickel au lieu de l'expulser. Nos résultats montrent qu'en plus d'un rôle de stockage, les protéines Hpn et Hpn-2 sont multifonctionnelles et jouent un rôle de régulation de l'uréase. Avec Hpn et Hpn-2, *H. pylori* se prémunit donc de deux risques : l'intoxication métallique, et l'intoxication par alcalinisation du cytoplasme en cas d'activité uréasique non contrôlée.

2. Perspectives

Les perspectives de ce travail sont nombreuses et visent principalement à tester nos hypothèses *in vivo*.

Il a été montré que la protéine Hpn purifiée pouvait former des fibres similaires à celles retrouvées dans la maladie d'Alzheimer (Ge & Sun, 2011). Une première analyse *in silico* réalisée par Iñaki Guijarro dans l'Unité de RMN des Biomolécules de l'Institut Pasteur nuance cependant la capacité de Hpn et Hpn-2 à former des fibres. En effet, dans l'article publié par Ge & Sun, les auteurs n'ont pas utilisé d'agent réducteur dans leur étude alors que Hpn peut former des ponts disulfures. De plus, *in silico*, les séquences de Hpn et Hpn-2 ne sont pas prédites pour être amyloïdogènes. Enfin, les protéines Hpn et Hpn-2 sont hydrophiles et chargées. Leur structure secondaire est probablement dépliée. Les fibres observées sont peut-être alors simplement des agrégats. En effet, les agrégats protéiques sont généralement riches en structures dépliées. Dans leur étude, Ge & Sun purifient la protéine Hpn sur colonne d'affinité au nickel. Ensuite, ils justifient le fait de ne pas utiliser d'agent réducteur pour éviter que le nickel ne soit chélaté ; le fait que la protéine ait été copurifiée avec du nickel et qu'elle puisse former

des *fibres* dans ces conditions n'est cependant pas une preuve que le nickel est indispensable à la formation des *fibres* (Ge & Sun, 2011).

Nous avons très récemment produit par fusions chromosomiques des souches de *H. pylori* dont les protéines Hpn et Hpn-2 sont respectivement étiquetées en C_{ter} par les épitopes hémagglutinine (HA) et V5. Ces outils seront très précieux pour la suite de notre étude.

Il nous paraît important de localiser précisément Hpn et Hpn-2 chez *H. pylori*. La première étude de Hpn rapportait une localisation cytoplasmique et membranaire de la protéine (Gilbert *et al*, 1995). Dans les souches exprimant les protéines Hpn et Hpn-2 fusionnées aux épitopes V5 et HA, nous pourrions réaliser un fractionnement cellulaire suivi de *Western blots* avec les anticorps spécifiques à chaque épitope. De plus, cette localisation pourra être réalisée plus précisément sur cellules entières en utilisant des anticorps couplés à des billes d'or et la microscopie électronique à transmission. La localisation de l'uréase sera également examinée. Nous proposons aussi d'étudier la localisation de Hpn et Hpn-2 dans la souche sauvage ou mutante pour *hpn* ou *hpn-2*, ainsi que dans des souches déficientes pour certaines protéines du métabolisme de l'ammoniac. De telles expériences permettraient de savoir si Hpn et Hpn-2 sont colocalisées, ou si elles sont associées avec l'uréase. Nous examinerons si des modifications du pH, de la concentration en nickel ou en urée modifient la localisation cellulaire de Hpn et Hpn-2.

Nous souhaitons savoir si Hpn et Hpn-2 forment des fibres amyloïdes *in vivo*. Grâce aux étiquettes HA et V5, nous pourrions rechercher par *Western blot* sur des extraits cellulaires de *H. pylori* des complexes insolubles de haut poids moléculaire dans le cytoplasme ou dans le milieu extérieur. Une autre approche consiste à exprimer les protéines Hpn et Hpn-2 séparément ou ensemble chez *E. coli*. Nous pourrions ainsi observer si ces protéines se retrouvent dans le milieu extracellulaire et si elles y forment des fibres ou des agrégats, seules ou en hétéromultimères. A défaut, nous pourrions déterminer si elles forment des corps d'inclusion insolubles dans le cytoplasme de *E. coli*. Il serait intéressant de tester l'effet du nickel sur la formation des agrégats ou des fibres.

Une des questions fondamentales de ce travail concerne l'organisation en réseau des protéines du métabolisme du nickel. Afin de tester si les protéines Hpn et Hpn-2 forment des complexes hétéromériques *in vivo* chez *H. pylori*, nous réaliserons des expériences de *pull down* à l'aide des étiquettes HA et V5. Ces expériences permettront de savoir si Hpn et Hpn-2 forment des complexes *in vivo* ainsi que la localisation cellulaire de ces complexes. De plus, nos résultats montrent que Hpn participe au chargement de l'uréase avec le nickel. Nous ne savons

pas si Hpn est capable de charger l'uréase par le biais de UreE, ou directement dans UreAB. Des résultats préliminaires obtenus en BACTH indiquent que Hpn n'interagit pas avec UreE. Par les expériences de *pull down* nous pourrions identifier le partenaire de Hpn et observer si la concentration en nickel ou le pH du milieu de culture influence la multimérisation de Hpn et la dynamique d'assemblage du complexe de Hpn avec ses partenaires.

Nos résultats indiquent que Hpn et Hpn-2 interviennent dans la régulation de l'activité uréasique. Pour tester l'apport des protéines Hpn et Hpn-2 dans l'activation de l'uréase, leur expression conjointe à celle du centre de l'uréase en système hétérologue pourrait être un moyen facile d'accès ; l'activité uréasique serait mesurée dans les différentes combinaisons possibles et permettrait de quantifier l'apport de chaque protéine au système.

Nous avons observé que l'uréase est synthétisée de façon constitutive en présence de nickel dans les mutants Hpn et Hpn-2, suggérant une dérégulation probablement associée au contrôle par NikR. Il faudrait mener des expériences de qRT-PCR pour suivre l'expression de l'uréase après exposition au nickel dans les mutants de *hpn* et *hpn-2*. En effet, l'induction temporelle de l'uréase par le nickel dans la souche sauvage pourrait s'expliquer par la séquestration séquentielle du nickel par Hpn-2 et Hpn. Il a déjà été montré que NikR entrait en compétition avec l'uréase et ses protéines accessoires pour l'accès aux ions nickel (Benanti & Chivers, 2009). Hpn et Hpn-2 participant à la voie d'activation de l'uréase, il est probable que des mutants de *hpn* et *hpn-2* présentent une réponse au nickel *via* NikR constitutive.

Nous ne savons pas par quel mécanisme Hpn-2 est capable de réguler la concentration intracellulaire de nickel. Nous postulons que Hpn-2 bloque le transport ou participe à un mécanisme d'efflux. Ces deux hypothèses seront testées à l'aide de $^{63}\text{Ni}^*$. Un modèle alternatif implique que Hpn-2 chargé en nickel pourrait être exporté dans le milieu extérieur. Le nickel, fixé sur Hpn-2 serait alors expulsé du cytoplasme en même tant que la protéine et ne risquerait alors plus d'être réimporté. Une façon simple de tester l'hypothèse de l'export est de réaliser une culture en conditions d'intoxications en nickel et de détecter la protéine dans le surnageant de culture grâce à son étiquette V5. De plus, nous avons montré que Hpn-2 était spécifique à l'espèce *H. pylori*. Si Hpn-2 était exporté, celui-ci serait capable de concentrer localement le nickel dans l'estomac. Or, Il a été montré que le nickel était un composé carcinogène, notamment pour les voies aériennes lorsqu'il est inhalé (Denkhaus & Salnikow, 2002). Par ce biais, Hpn-2 pourrait participer à la cancérogenèse.

Une autre hypothèse originale issue de ce travail est la synthèse de deux formes de Hpn-2 : une forme tronquée dépourvue d'extension riche en glutamine en cas d'activité uréasique faible, et une forme complète en cas de synthèse abondante d'ammoniac. En mettant au point une

méthode de purification de Hpn-2, cette hypothèse serait facile à tester avec du glutamate radioactif, en modulant l'activité de l'uréase. Une autre stratégie consisterait à étiqueter la protéine avec un épitope en N_{ter} et un autre en C_{ter} permettant de réaliser le ratio protéines tronquées/protéines entières.

Il serait aussi intéressant d'investiguer le comportement de mutants de Hpn et Hpn-2 dans un fond génétique déficient pour HspA, autre protéine de fixation du nickel. En effet, même si HspA ne régule pas l'activité uréasique, sa capacité à fixer le nickel occasionne nécessairement une compétition avec Hpn et Hpn-2 pour l'accès au métal. Une telle étude permettrait de mieux *décortiquer* le processus de trafic du nickel dépendant de Hpn et Hpn-2.

De plus, et afin de mieux comprendre le réseau d'interactions qui s'établit au sein des protéines du métabolisme du nickel, nous souhaitons élargir l'étude menée en BACTH aux autres protéines du métabolisme du nickel : NikR, SlyD, UreEFGH, HydAB, HypABC, NixA. Il nous paraît aussi intéressant de tester les interactions lorsque le milieu est supplémenté en nickel. Enfin, nous souhaitons identifier les résidus importants dans les interactions pour ensuite réaliser *in vivo* la mutagenèse dirigée de ces résidus. Nous quantifierons ensuite l'activité uréasique, la sensibilité au nickel, et la concentration intracellulaire en nickel chez ces mutants.

Il n'existe aucune donnée portant sur l'influence du nickel lors de la colonisation de l'hôte. Nous avons montré que les mutants *hpn* et *hpn-2* sont sévèrement affectés dans leur capacité à coloniser l'hôte. Il serait intéressant de tester si la supplémentation avec du nickel de l'alimentation des souris utilisées comme modèle de colonisation est capable de restaurer la capacité de colonisation de ces mutants. De manière générale, il est intéressant de savoir si le nickel a un effet sur la colonisation et l'inflammation par une souche sauvage. Nous souhaitons également réaliser la cinétique d'élimination des mutants *hpn* et *hpn-2*, seuls ou en compétition avec la souche sauvage, afin de déterminer à quelle étape de la colonisation l'infection est affectée par la délétion de *hpn* et *hpn-2*.

Pour finir, le bismuth est un composé thérapeutique utilisé dans l'éradication de *H. pylori*. Aucune publication ne fait état de souches cliniques résistantes au bismuth. De plus, le mode d'action du bismuth est inconnu. Nous avons montré que Hpn exerçait un effet protecteur contre l'intoxication de *H. pylori* avec le bismuth. Cette observation indique que le bismuth pourrait exercer sa toxicité *in vivo* par compétition avec le nickel dans la voie d'activation de l'uréase. Nous souhaitons donc mesurer la toxicité du bismuth dans les différents mutants des gènes codant pour des protéines impliquées dans la résistance au nickel et l'activation de l'uréase. Des expériences sont en cours dans notre laboratoire pour identifier des mutants

résistants au bismuth à l'aide d'une banque de mutants de transposition réalisée chez *H. pylori* (Salama *et al*, 2004). L'identification de ces mutants permettra de mieux comprendre les mécanismes d'action du bismuth et ainsi, d'anticiper l'émergence de souches cliniques résistantes.

Chapitre 3. Conclusion générale

H. pylori est une bactérie unique, responsable de l'infection pathogénique la plus répandue à la surface du globe. L'originalité de *H. pylori* réside dans sa capacité à établir une colonisation durable dans une niche extrêmement hostile, l'estomac. Cette capacité repose sur un mécanisme de défense contre l'acidité très efficace, la production d'ammoniac. La majeure partie de la production d'ammoniac provient d'une abondante uréase à nickel. Le métabolisme du nickel et de l'ammoniac sont donc fortement interdépendants et leur étude a fait l'objet de mon travail de thèse.

Le métabolisme de l'ammoniac ne se limite pas à la réponse d'urgence à l'acidité. Nous avons identifié des systèmes d'hydrolyse de l'asparagine et de la glutamine, couplés au transport d'aspartate et de glutamate, respectivement. Chacun des partenaires de ces systèmes couplés est important dans la colonisation du modèle animal. Nous avons aussi montré que l'hydrolyse de l'asparagine et de la glutamine dans le périplasme de *H. pylori* est responsable d'une synthèse d'ammoniac, qui, conjointement à la réponse d'urgence à l'acidité, va exposer les cellules gastriques à de fortes concentrations en ammoniac. Cette production d'ammoniac ainsi que la déplétion locale en acides aminés protecteurs comme la glutamine et l'asparagine participent très probablement à la cytotoxicité.

Le métabolisme de l'ammoniac met en œuvre des complexes enzymatiques. Nous avons montré que ces complexes protéiques agissent probablement de manière concertée afin d'optimiser la biodisponibilité de l'ammoniac par un *channeling* métabolique de ce composé entre enzymes productrices et enzymes consommatrices.

L'uréase de *H. pylori* est la plus active jamais décrite, son activité doit donc être finement contrôlée afin d'éviter à la bactérie d'être intoxiquée par l'alcalinisation de son cytoplasme. Nous avons mis en évidence que deux petites protéines très riches en histidine, Hpn et Hpn-2, participent à la régulation de l'activité uréasique en modulant le chargement en nickel de l'uréase. Ces protéines sont aussi impliquées dans la détoxification du cytoplasme en nickel et dans le maintien de l'homéostasie du nickel.

Nos résultats indiquent que le maintien de l'homéostasie du nickel implique l'extension riche en glutamine de Hpn-2. Chez *H. pylori*, la glutamine est synthétisée à partir du glutamate et de l'ammoniac, probablement de manière optimisée grâce à un couplage entre l'uréase et la glutamine synthétase. On observe donc des régulations réciproques entre les deux métabolismes complémentaires, nickel et ammoniac.

H. pylori est un pathogène persistant. La cohabitation au long cours avec son hôte est associée à une pathogenèse *maîtrisée*. La colonisation de la muqueuse gastrique dépend de l'approvisionnement en nutriments très variables. Si le bol alimentaire apporte les nutriments en abondance, il est par exemple admis que l'urée est une molécule apportée par voie sanguine. Le passage des nutriments au travers de la barrière épithéliale est donc primordial. Les effecteurs cytotoxiques VacA et CagA endommagent fortement la muqueuse gastrique. Les mécanismes originaux de pathogenèse dont nous faisons l'hypothèse permettraient donc une attaque *ménagée* de l'épithélium par l'ammoniac et la déplétion en acides aminés, dont l'altération conduirait à la perfusion des nutriments.

Nos travaux montrent que Hpn et Hpn-2 sont les acteurs centraux de l'activation de l'uréase et qu'ils sont nécessaires à la colonisation du modèle animal.

Dans le contexte actuel d'augmentation de la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques utilisés pour éradiquer l'infection, le bismuth s'impose comme un traitement de choix. Nous avons montré que Hpn est probablement une cible du bismuth. A ce jour, il n'a pas été identifié de protéines nécessitant du nickel chez l'homme. Les protéines Hpn et Hpn-2 possèdent une séquence et des propriétés uniques qui en font des cibles thérapeutiques de premier ordre. Le développement de nouvelles molécules curatives pourrait alors cibler les protéines du métabolisme du nickel, ou leur capacité à former des complexes dynamiques.

Bibliographie

- Akompong T, Kadekoppala M, Harrison T, Oksman A, Goldberg DE, Fujioka H, Samuel BU, Sullivan D & Halder K (2002) Trans expression of a *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II (HRPII) reveals sorting of soluble proteins in the periphery of the host erythrocyte and disrupts transport to the malarial food vacuole. *The Journal of biological chemistry* **277**: 28923-33
- Albrecht J, Zielińska M & Norenberg MD (2010) Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochemical pharmacology* **80**: 1303-8
- Andrews SC (1998) Iron storage in bacteria. *Advances in microbial physiology* **40**: 281-351
- Andrews SC, Robinson AK & Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 215-237
- Arnold IC, Dehzad N, Reuter S, Martin H, Becher B, Taube C & Müller A (2011) Brief report *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* **121**: 3088-93
- Ashktorab H, Neapolitano M, Bomma C, Allen C, Ahmed A, Dubois A, Naab T & Smoot DT (2002) In vivo and in vitro activation of caspase-8 and -3 associated with *Helicobacter pylori* infection. *Microbes and Infection* **4**: 713-22
- Atherton JC (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual review of pathology* **1**: 63-96
- Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ & Cover TL (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *The Journal of biological chemistry* **270**: 17771-7
- Athmann C, Zeng N, Kang T, Marcus E a, Scott DR, Rektorschek M, Buhmann a, Melchers K & Sachs G (2000) Local pH elevation mediated by the intrabacterial urease of *Helicobacter pylori* cocultured with gastric cells. *The Journal of clinical investigation* **106**: 339-47
- Babich H & Stotzky G (1983) Toxicity of nickel to microbes: environmental aspects. *Advances in applied microbiology* **29**: 195-265
- Backert S & Clyne M (2011) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **16 Suppl 1**: 19-25
- Bahlawane C, Dian C, Muller C, Round a, Fauquant C, Schauer K, de Reuse H, Terradot L & Michaud-Soret I (2010) Structural and mechanistic insights into *Helicobacter pylori* NikR activation. *Nucleic acids research* **38**: 3106-18
- Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar a R & Norenberg MD (2001) Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *Journal of neuroscience research* **66**: 981-91
- Ban K & Kozar RA (2010) Glutamine protects against apoptosis via downregulation of Sp3 in intestinal epithelial cells. *American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology* **299**: G1344-53
- Banaszak K, Martin-Diaconescu V, Bellucci M, Zambelli B, Rypniewski W, Maroney MJ & Ciurli S (2012) Crystallographic and X-ray absorption spectroscopic characterization of *Helicobacter pylori* UreE bound to Ni²⁺ and Zn²⁺ reveals a role for the disordered C-terminal arm in metal trafficking. *The Biochemical journal* **441**: 1017-26
- Bauerfeind P, Garner RM & Mobley HLT (1996) Allelic exchange mutagenesis of nixA in *Helicobacter pylori* results in reduced nickel transport and urease activity. *Infection and immunity* **64**: 2877-80
- Beisele M, Shen Z, Parry N, Mobley M, Taylor NS, Buckley E, Abedin MZ, Dewhirst FE & Fox JG (2011) *Helicobacter marmotae* and novel *Helicobacter* and *Campylobacter* species isolated from the livers and intestines of prairie dogs. *Journal of Medical Microbiology* **60**: 1366-74
- Bellucci M, Zambelli B, Musiani F, Turano P & Ciurli S (2009) *Helicobacter pylori* UreE, a urease accessory protein: specific Ni(2+)- and Zn(2+)-binding properties and interaction with its cognate UreG. *The Biochemical journal* **422**: 91-100
- Benanti EL & Chivers PT (2009) An intact urease assembly pathway is required to compete with NikR for nickel ions in *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology* **191**: 2405-8
- Benini S, Ciurli S, Nolting HF & Mangani S (1996) X-ray absorption spectroscopy study of native and phenylphosphorodiamidate-inhibited *Bacillus pasteurii* urease. *European journal of biochemistry / FEBS* **239**: 61-6
- Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Mangani S & Ciurli S (2004) Molecular details of urease inhibition by boric acid: insights into the catalytic mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **126**: 3714-5

- Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Miletto S, Ciurli S & Mangani S (1999) A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure (London, England : 1993)* **7**: 205-16
- Benoit SL & Maier RJ (2003) Dependence of *Helicobacter pylori* Urease Activity on the Nickel-Sequestering Ability of the UreE Accessory Protein. *Journal of bacteriology* **185**: 4787-4795
- Benoit SL & Maier RJ (2008) Hydrogen and nickel metabolism in *Helicobacter* species. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**: 242-51
- Benoit SL, Mehta N, Wang G, Gatlin M & Maier RJ (2004) Requirement of hydD, hydE, hypC and hypE genes for hydrogenase activity in *Helicobacter pylori*. *Microbial Pathogenesis* **36**: 153-157
- Blaser MJ (2012) Heterogeneity of *Helicobacter pylori*. *European journal of gastroenterology & hepatology* **9 Suppl 1**: S3-7
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN & Nomura A (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer research* **55**: 2111-5
- Blokesch M, Albracht SPJ, Matzanke BF, Drapal NM, Jacobi A & Böck A (2004a) The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *Journal of molecular biology* **344**: 155-67
- Blokesch M, Paschos A, Bauer A, Reissmann S, Drapal N & Böck A (2004b) Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**: 3428-36
- Boquet P & Ricci V (2012) Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Trends in microbiology*: 1-10
- Bos J (2008) Etude de la Régulation de l'expression du gène msrB codant pour la Méthionine Sulfoxyde Réductase B, par le petit ARN non codant RyhB, senseur de l'homéostasie du fer chez *Escherichia coli*.
- Bouveret E & Brun C (2012) Bacterial Interactomes: From Interactions to Networks. *Methods in Molecular Biology* **804**: 15-33
- Braun V & Braun M (2002) Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS letters* **529**: 78-85
- Brown LM (2000) *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic reviews* **22**: 283-97
- Buck GE (1990) *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Clinical microbiology reviews* **3**: 1-12
- Bury-Moné S, Skouloubris S, Dauga C, Thiberge J-M, Dailidiene D, Berg DE, Labigne A, De Reuse H & Reuse HD (2003) Presence of Active Aliphatic Amidases in *Helicobacter* Species Able To Colonize the Stomach. *Infection and Immunity* **71**: 5613-5622
- Bury-Moné S, Skouloubris S, Labigne A & De Reuse H (2001) The *Helicobacter pylori* UreI protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Molecular microbiology* **42**: 1021-1034
- Bury-Moné S, Thiberge J-M, Contreras M, Maitournam A, Labigne A & De Reuse H (2004) Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Molecular microbiology* **53**: 623-38
- Bush AI (2012) The Metal Theory of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*
- Busiello I, Acquaviva R, Di Popolo A, Blanchard TG, Ricci V, Romano M, Zarrilli R & Popolo AD (2004) *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells. *Cellular microbiology* **6**: 255-267
- Bäckström A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Borén T & Arnqvist A (2004) Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 16923-8
- Cappelletti D, Chiarelli LR, Pasquetto MV, Stivala S, Valentini G & Scotti C (2008) *Helicobacter pylori*-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Biochemical and biophysical research communications* **377**: 1222-6
- Cappon A, Babolin C, Segat D, Cancian L, Amedei A, Calzetti F, Cassatella M a, D'Elis MM & de Bernard M (2010) *Helicobacter pylori*-derived neutrophil-activating protein increases the lifespan of monocytes and neutrophils. *Cellular microbiology* **12**: 754-64
- Carroll IM, Khan A & Ahmed N (2004) Revisiting the pestilence of *Helicobacter pylori*: insights into geographical genomics and pathogen evolution. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **4**: 81-90
- Carter EL, Flugga N, Boer JL, Mulrooney SB & Hausinger RP (2009) Interplay of metal ions and urease. *Metallomics: integrated biometal science* **1**: 207-21

- Casadaban MJ & Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **138**: 179-207
- Cavanna L, Pagani R, Seghini P, Zangrandi A & Paties C (2008) High grade B-cell gastric lymphoma with complete pathologic remission after eradication of *Helicobacter pylori* infection: report of a case and review of the literature. *World journal of surgical oncology* **6**: 35
- Cavazza C, Bochot C, Rousselot-Pailley P, Carpentier P, Cherrier MV, Martin L, Marchi-Delapierre C, Fontecilla-Camps JC & Ménage S (2010) Crystallographic snapshots of the reaction of aromatic C-H with O(2) catalysed by a protein-bound iron complex. *Nature chemistry* **2**: 1069-76
- Cavazza C, Martin L, Laffly E, Lebrette H, Cherrier MV, Zeppieri L, Richaud P, Carrière M & Fontecilla-Camps JC (2011) Histidine 416 of the periplasmic binding protein NikA is essential for nickel uptake in *Escherichia coli*. *FEBS letters* **585**: 711-5
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R & Covacci a (1996) cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 14648-53
- Chan Chung KC & Zamble DB (2011) Protein interactions and localization of the *Escherichia coli* accessory protein HypA during nickel insertion to [NiFe] hydrogenase. *The Journal of biological chemistry* **286**: 43081-90
- Chen W, Shu D, Chadwick VS, Wakefield T, Hospital W & Zealand N (2001) Reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10. *Journal of gastroenterology and hepatology* **16**: 377-383
- Cheng T, Li H, Xia W & Sun H (2012) Multifaceted SlyD from *Helicobacter pylori*: implication in [NiFe] hydrogenase maturation. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **17**: 331-43
- Chevalier C, Thiberge J & Ferrero R (1999a) Essential role of *Helicobacter pylori* γ-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Molecular Microbiology* **31**: 1359-1372
- Chevalier C, Thiberge J-michel M, Ferrero RL & Labigne A (1999b) Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Molecular microbiology* **31**: 1359-72
- Chinda D, Nakaji S, Fukuda S, Sakamoto J, Shimoyama T, Nakamura T, Fujisawa T, Terada A & Sugawara K (2004) The fermentation of different dietary fibers is associated with fecal clostridia levels in men. *The Journal of nutrition* **134**: 1881-6
- Chivers PT & Sauer RT (1999) NikR is a ribbon-helix-helix DNA-binding protein. *Protein science: a publication of the Protein Society* **8**: 2494-500
- Chivers PT & Tahirov TH (2005) Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition. *Journal of molecular biology* **348**: 597-607
- Churin Y, Al-Ghoul L, Kepp O, Meyer TF, Birchmeier W & Naumann M (2003) *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *The Journal of cell biology* **161**: 249-55
- Contreras M, Thiberge J-M, Mandrand-Berthelot M-A & Labigne A (2003) Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology* **49**: 947-963
- Cover TL & Blanke SR (2005) *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature reviews. Microbiology* **3**: 320-32
- Cover TL & Blaser MJ (2009) *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology* **136**: 1863-73
- Cussac V, Ferrero RL & Labigne A (1992) Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *Journal of bacteriology* **174**: 2466-73
- Danielli A, Amore G & Scarlato V (2010) Built shallow to maintain homeostasis and persistent infection: insight into the transcriptional regulatory network of the gastric human pathogen *Helicobacter pylori*. *PLoS pathogens* **6**: e1000938
- Danielli A & Scarlato V (2010) Regulatory circuits in *Helicobacter pylori*: network motifs and regulators involved in metal-dependent responses. *FEMS microbiology reviews* **34**: 738-52
- Davis GS & Mobley HLT (2005) Contribution of dppA to urease activity in *Helicobacter pylori* 26695. *Helicobacter* **10**: 416-423
- Degen O, Kobayashi M, Shimizu S & Eitinger T (1999) Selective transport of divalent cations by transition metal permeases: the *Alcaligenes eutrophus* HoxN and the *Rhodococcus rhodochrous* NhlF. *Archives of microbiology* **171**: 139-45

- Delany I, Ieva R, Soragni A, Hilleringmann M, Rappuoli R, Scarlato V & Acteriol JB (2005) In Vitro Analysis of Protein-Operator Interactions of the NikR and Fur Metal-Responsive Regulators of Coregulated Genes in *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology* **187**: 7703-7715
- Denkhaus E & Salnikow K (2002) Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical reviews in oncology/hematology* **42**: 35-56
- Deuss PJ, den Heeten R, Laan W & Kamer PCJ (2011) Bioinspired catalyst design and artificial metalloenzymes. *Chemistry* **17**: 4680-98
- Dian C, Schauer K, Kapp U, McSweeney SM, Labigne A & Terradot L (2006) Structural basis of the nickel response in *Helicobacter pylori*: crystal structures of HpNikR in Apo and nickel-bound states. *Journal of molecular biology* **361**: 715-30
- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W & Quint W (1998) Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**: 58-66
- Drechsel H & Winkelmann G (1997) Iron chelating and siderophores. In *Transition metals in microbial metabolism*, Winkelmann G & Carrano CJ (eds) pp 1-49. Amsterdam: Harwood Academic
- D'Elios MM, Amedei A, Cappon A, Del Prete G & de Bernard M (2007) The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS immunology and medical microbiology* **50**: 157-64
- Eaton KA & Krakowka S (1994) Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity* **62**: 3604-7
- Eaton KA, Morgan DR & Krakowka S (1989) *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infection and immunity* **57**: 1119-25
- Eftang LL, Esbensen Y, Tannæs TM, Bukholm IRK & Bukholm G (2012) Interleukin-8 is the single most up-regulated gene in whole genome profiling of H. *pylori* exposed gastric epithelial cells. *BMC microbiology* **12**: 9
- Eitinger T, Suhr J, Moore L & Smith JAC (2005) Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **18**: 399-405
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF & Rabkin CS (2001) The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature* **412**: 99
- Eppinger M, Baar C, Linz B, Raddatz G, Lanz C, Keller H, Morelli G, Gressmann H, Achtman M & Schuster SC (2006) Who Ate Whom? Adaptive *Helicobacter* Genomic Changes That Accompanied a Host Jump from Early Humans to Large Felines. *PLoS Genetics* **2**: e120
- Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M & Suerbaum S (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science (New York, N.Y.)* **299**: 1582-5
- Fan X, Gunasena H, Cheng Z, Crowe SE, Ernst PB & Reyes VE (2000) *Helicobacter pylori* Urease Binds to Class II MHC on Gastric Epithelial Cells and Induces Their Apoptosis. *The journal of immunology* **165**: 1918-1924
- Fantino J-R, Py B, Fontecave M & Barras F (2010) A genetic analysis of the response of *Escherichia coli* to cobalt stress. *Environmental microbiology* **12**: 2846-57
- Farnbacher M, Jahns T, Willrodt D, Daniel R, Haas R, Goesmann A, Kurtz S & Rieder G (2010) Sequencing, annotation, and comparative genome analysis of the gerbil-adapted *Helicobacter pylori* strain B8. *BMC genomics* **11**: 335
- Ferguson AD, Chakraborty R, Smith BS, Esser L, van der Helm D & Deisenhofer J (2002) Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science (New York, N.Y.)* **295**: 1715-9
- Fibriansah G, Veetil VP, Poelarends GJ & Thunnissen A-MWH (2011) Structural basis for the catalytic mechanism of aspartate ammonia lyase. *Biochemistry* **50**: 6053-62
- Fields S & Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-6
- Fischer F, Huot JL, Lorber B, Diss G, Hendrickson TL, Becker HD, Lapointe J & Kern D (2012) The asparagine-transamidosome from *Helicobacter pylori*: a dual-kinetic mode in non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase safeguards the genetic code. *Nucleic acids research*
- Fong YH, Wong HC, Chuck CP, Chen YW, Sun H & Wong K-B (2011) Assembly of preactivation complex for urease maturation in *Helicobacter pylori*: crystal structure of UreF-UreH protein complex. *The Journal of biological chemistry* **286**: 43241-9
- Fontecave M (2006) Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature chemical biology* **2**: 171-4

- Fontecave M, Covès J & Pierre JL (1994) Ferric reductases or flavin reductases? *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **7**: 3-8
- Forchhammer K (2007) Glutamine signalling in bacteria. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **12**: 358-70
- Foster JW (2004) *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature reviews. Microbiology* **2**: 898-907
- Fox JG (2002) The non-H *pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* **50**: 273-283
- Franco AT, Israel D a, Washington MK, Krishna U, Fox JG, Rogers AB, Neish AS, Collier-Hyams L, Perez-Perez GI, Hatakeyama M, Whitehead R, Gaus K, O'Brien DP, Romero-Gallo J & Peek RM (2005) Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10646-51
- Frazzon J & Dean DR (2001) Feedback regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14751-3
- Fricke WF, Wright MS, Lindell AH, Harkins DM, Baker-Austin C, Ravel J & Stepanauskas R (2008) Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental isolate *Escherichia coli* SMS-3-5. *Journal of bacteriology* **190**: 6779-94
- Fricker MD, Lee JA, Bebbler DP, Tlalka M, Hynes J, Darrah PR, Watkinson SC & Boddy L (2008) Imaging complex nutrient dynamics in mycelial networks. *Journal of microscopy* **231**: 317-31
- Fukumatsu M, Ogawa M, Arakawa S, Suzuki M, Nakayama K, Shimizu S, Kim M, Mimuro H & Sasakawa C (2012) Shigella Targets Epithelial Tricellular Junctions and Uses a Noncanonical Clathrin-Dependent Endocytic Pathway to Spread Between Cells. *Cell Host & Microbe* **11**: 325-336
- Fulkerson JF & Mobley HLT (2000) Membrane Topology of the NixA Nickel Transporter of *Helicobacter pylori*: Two Nickel Transport-Specific Motifs within Transmembrane Helices II and III. *Journal of bacteriology* **182**: 1722-1730
- Garner RM, Fulkerson J & Mobley HLT (1998) *Helicobacter pylori* glutamine synthetase lacks features associated with transcriptional and posttranslational regulation. *Infection and immunity* **66**: 1839-47
- Ge R & Sun X (2011) The in vivo functions of a histidine-rich protein Hpn in *Helicobacter pylori*. Linking gastric and Alzheimer's diseases together? *Medical hypotheses* **77**: 788-90
- Ge R, Sun X, Wang D, Zhou Q & Sun H (2011) Histidine-rich protein Hpn from *Helicobacter pylori* forms amyloid-like fibrils in vitro and inhibits the proliferation of gastric epithelial AGS cells. *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 1422-7
- Ge R, Watt RM, Sun X, Tanner J a, He Q-yu, Huang J-D & Sun H (2006) Expression and Characterization of the Histidine-rich Protein, Hpn: Potential for Nickel Storage in *Helicobacter pylori*. *Journal of biochemistry* **393**: 285-293
- Gebert B, Fischer WW, Weiss E, Hoffmann R & Haas R (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**: 1099-102
- Gilbert JV, Ramakrishna J, Sunderman FW, Wright a & Plaut a G (1995) Protein Hpn: cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*. *Infection and immunity* **63**: 2682-8
- Gisbert JP & Calvet X (2012) Update on non-bismuth quadruple (concomitant) therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Clinical and experimental gastroenterology* **5**: 23-34
- Del Giudice G, Malforteiner P & Rappuoli R (2009) Development of vaccines against *Helicobacter pylori*. *Expert review of vaccines* **8**: 1037-49
- Glusker JP, Katz AMYK & Bock CW (1999) Metal ions in biological systems. *The Rigaku Journal* **16**: 8-17
- Gobert a P, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HL & Wilson KT (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13844-9
- Gong M, Ling SSM, Lui SY, Yeoh KG & Ho B (2010) *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* **139**: 564-73
- Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA & Wee SH (1985) Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *Journal of medical microbiology* **19**: 257-67

- Grass G, Franke S, Taudte N, Nies DH, Kucharski LM, Maguire ME & Rensing C (2005) The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *Journal of bacteriology* **187**: 1604-11
- Green MR & Sambrook J (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Greene SE & Komeili A (2012) Biogenesis and subcellular organization of the magnetosome organelles of magnetotactic bacteria. *Current Opinion in Cell Biology*: 1-6
- Grossoehme NE, Mulrooney SB, Hausinger RP & Wilcox DE (2007) Thermodynamics of Ni²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ binding to the urease metallochaperone UreE. *Biochemistry* **46**: 10506-16
- Grubman A, Kaparakis M, Viala J, Allison C, Badea L, Karrar A, Boneca IG, Le Bourhis L, Reeve S, Smith I a, Hartland EL, Philpott DJ & Ferrero RL (2010) The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of *Helicobacter pylori* by antimicrobial peptides. *Cellular microbiology* **12**: 626-39
- Guruge JL, Falk PG, Lorenz RG, Dans M, Wirth HP, Blaser MJ, Berg DE & Gordon JI (1998) Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3925-3930
- Ha N-chul, Oh S-taek, Sung JY, Cha KA, Lee MH & Oh B-ha (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature structural biology* **8**: 505-509
- Haas G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, Diescher S, Goebel UB, Vogt K, Roznowski AB, Wiedenmann BJ, Meyer TF, Aebischer T & Jungblut PR (2002) Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics* **2**: 313-24
- Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, Smet A, Vandamme P & Ducatelle R (2011) Non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* species in the human gastric mucosa: a proposal to introduce the terms *H. heilmannii* sensu lato and *sensu stricto*. *Helicobacter* **16**: 339-40
- Hagen SJ, Ohtani M, Zhou J-R, Taylor NS, Rickman BH, Blackburn GL & Fox JG (2009) Inflammation and foveolar hyperplasia are reduced by supplemental dietary glutamine during *Helicobacter pylori* infection in mice. *The Journal of nutrition* **139**: 912-8
- Hantke K (1987) Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Molecular & general genetics : MGG* **210**: 135-9
- Hantke K (2003) Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends in microbiology* **11**: 192-5
- Hausinger RP (1987) Nickel utilization by microorganisms. *Microbiological reviews* **51**: 22-42
- Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M & Hatakeyama M (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**: 683-686
- Higgs PI, Myers PS & Postle K (1998) Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *Journal of bacteriology* **180**: 6031-8
- Hofreuter D, Novik V & Galán J (2008) Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host & Microbe* **4**: 425-433
- Howlett RM, Hughes BM, Hitchcock A & Kelly DJ (2012) Hydrogenase activity in the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* depends upon a novel ABC-type nickel transporter (NikLMNOP) and is SlyD independent. *Microbiology (Reading, England)*
- Hu LT & Mobley HLT (1990) Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity* **58**: 992-8
- Huot JL, Fischer F, Corbeil J, Madore E, Lorber B, Diss G, Hendrickson TL, Kern D & Lapointe J (2011) Gln-tRNA^{Gln} synthesis in a dynamic transamidosome from *Helicobacter pylori*, where GluRS2 hydrolyzes excess Glu-tRNA^{Gln}. *Nucleic acids research* **39**: 9306-15
- Ilver D, Amqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L & Borén T (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science (New York, N.Y.)* **279**: 373-377
- International Agency for Research on Cancer (1990) Chromium, nickel and welding IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (ed) Lyon: IARC Monographs
- International Agency for Research on Cancer (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC Monographs
- International Agency for Research on Cancer (2008) Stomach Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. *GLOBOCAN*. 1 Available at: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/stomach.asp>
- Izzotti A, Durando P, Ansaldi F, Gianiorio F & Pulliero A (2009) Interaction between *Helicobacter pylori*, diet, and genetic polymorphisms as related to non-cancer diseases. *Mutation research* **667**: 142-57

- Izzotti A, De Flora S, Cartiglia C, Are BM, Longobardi M, Camoirano A, Mura I, Dore MP, Scanu AM, Rocca PC, Maida A & Piana A (2007) Interplay between *Helicobacter pylori* and host gene polymorphisms in inducing oxidative DNA damage in the gastric mucosa. *Carcinogenesis* **28**: 892-8
- Jain P, Luo Z-Q & Blanke SR (2011) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A (VacA) engages the mitochondrial fission machinery to induce host cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 16032-7
- James LA, Lunn PG, Middleton S & Elia M (1998) Distribution of glutaminase and glutamine synthetase activities in the human gastrointestinal tract. *Clinical science (London, England: 1979)* **94**: 313-9
- Javelle A, Thomas G, Marini A-M, Krämer R & Merrick M (2005) In vivo functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. *The Biochemical journal* **390**: 215-22
- Joint Center for Structural Genomics (2008) Crystal structure of aminotransferase AspB (NP_207418.1) from *HELICOBACTER PYLORI* 26695 at 2.19 Å resolution. *Protein Data Bank*: 1 Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3EZS> [Accessed June 26, 2012]
- Jones AL, Hulett MD & Parish CR (2005) Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunology and cell biology* **83**: 106-18
- Joshi S, Husain MM, Chandra R, Hasan SK & Srivastava RC (2005) Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nickel complexes of L-histidine, glutathione or L-cysteine and hydrogen peroxide. *Human & experimental toxicology* **24**: 13-7
- Kallweit AR, Baird CH, Stutzman DK & Wischmeyer PE (2012) Glutamine Prevents Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells and Induces Differential Protective Pathways in Heat and Oxidant Injury Models. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*
- Kaluarachchi H, Siebel JF, Kaluarachchi-Duffy S, Krecisz S, Sutherland DEK, Stillman MJ & Zamble DB (2011a) Metal selectivity of the *Escherichia coli* nickel metallochaperone, SlyD. *Biochemistry* **50**: 10666-77
- Kaluarachchi H, Zhang JW & Zamble DB (2011b) *Escherichia coli* SlyD, more than a Ni(II) reservoir. *Biochemistry* **50**: 10761-3
- Kansau I, Guillain F, Thiberge JM & Labigne A (1996) Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA). *Molecular microbiology* **22**: 1013-23
- Karimova G, Pidoux J, Ullmann A & Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5752-6
- Karimova G, Ullmann A & Ladant D (2001) Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **3**: 73-82
- Kavermann H, Burns BBPB, Angermüller K, S, Angermüller K, Odenbreit S, Fischer W, Melchers K & Haas R (2003) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *The Journal of Experimental Medicine* **197**: 813-822
- Kido M, Tanaka J, Aoki N, Iwamoto S, Nishiura H, Chiba T & Watanabe N (2010) *Helicobacter pylori* promotes the production of thymic stromal lymphopoietin by gastric epithelial cells and induces dendritic cell-mediated inflammatory Th2 responses. *Infection and immunity* **78**: 108-14
- Kim K-M, Lee S-G, Kim J-M, Kim D-S, Song J-Y, Kang H-L, Lee W-K, Cho M-J, Rhee K-H, Youn H-S & Baik S-C (2010) *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* **48**: 372-7
- Kim K-mi, Lee S-gyu, Park M-gyu, Song J-Y, Kang H-lyun, Lee W-kon, Cho M-J, Rhee K-ho, Youn H-S & Baik S-C (2007) c-Glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**: 562-567
- Kostrzynska M, Betts JD, Austin JW & Trust TJ (1991) Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *Journal of bacteriology* **173**: 937-46
- Kountouras J, Boziki M, Zavos C, Gavalas E, Giartzia-Taxidou E, Venizelos I, Deretzi G, Grigoriadis N, Tsiaousi E & Vardaka E (2012) A potential impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease pathobiology and course. *Neurobiology of aging* **33**: e3-e4
- Kusters JG, van Vliet AHM & Kuipers EJ (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews* **19**: 449-90

- Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R & Fischer W (2008) Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *Journal of bacteriology* **190**: 2161-71
- Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, Misselwitz R, Berger J, Sewald N, König W & Backert S (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**: 862-6
- Köster W (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in microbiology* **152**: 291-301
- Labigne A, Cussac V & Courcoux P (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *Journal of bacteriology* **173**: 1920-31
- Lai C-H, Wang H-J, Chang Y-C, Hsieh W-C, Lin H-J, Tang C-H, Sheu J-J, Lin C-J, Yang M-S, Tseng S-F & Wang W-C (2011) *Helicobacter pylori* CagA-mediated IL-8 induction in gastric epithelial cells is cholesterol-dependent and requires the C-terminal tyrosine phosphorylation-containing domain. *FEMS microbiology letters* **323**: 155-63
- Lam R, Romanov V, Johns K, Bataille KP, Wu-Brown J, Guthrie JL, Hausinger RP, Pai EF & Chirgadze NY (2010) Crystal structure of a truncated urease accessory protein UreF from *Helicobacter pylori*. *Proteins* **78**: 2839-48
- Leach MR & Zamble DB (2007) Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Current opinion in chemical biology* **11**: 159-65
- Leduc D, Gallaud J, Stingl K & de Reuse H (2010) Coupled Amino Acid Deamidase-Transport Systems Essential for *Helicobacter pylori* Colonization. *Infection and immunity* **78**: 2782-92
- Leigh J a & Dodsworth J a (2007) Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annual review of microbiology* **61**: 349-77
- Lertsethtakarn P, Ottemann KM & Hendrixson DR (2011) Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annual review of microbiology* **65**: 389-410
- Lewis ND, Asim M, Barry DP, de Sablet T, Singh K, Piazuelo MB, Gobert AP, Chaturvedi R & Wilson KT (2011) Immune evasion by *Helicobacter pylori* is mediated by induction of macrophage arginase II. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**: 3632-41
- Li Y & Zamble DB (2009a) pH-responsive DNA-binding activity of *Helicobacter pylori* NikR. *Biochemistry* **48**: 2486-96
- Li Y & Zamble DB (2009b) Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. *Chemical reviews* **109**: 4617-43
- Lie-Venema H, de Boer PA, Moorman AF & Lamers WH (1997) Role of the 5' enhancer of the glutamine synthetase gene in its organ-specific expression. *The Biochemical journal* **323** (Pt 3): 611-9
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-8
- Lin W-C, Tsai H-F, Kuo S-H, Wu M-S, Lin C-W, Hsu P-I, Cheng A-L & Hsu P-N (2010) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer research* **70**: 5740-8
- Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S & Achtman M (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* **445**: 915-8
- Lièvremon D, Bertin PN & Lett M-C (2009) Arsenic in contaminated waters: biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie* **91**: 1229-37
- Loiseau L, Ollagnier-de-Choudens S, Nachin L, Fontecave M & Barras F (2003) Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *The Journal of biological chemistry* **278**: 38352-9
- Machado AMD, Figueiredo C, Touati E, Máximo V, Sousa S, Michel V, Carneiro F, Nielsen FC, Seruca R & Rasmussen LJ (2009) *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 2995-3002
- Macomber L, Elsey SP & Hausinger RP (2011) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (class II) is the primary site of nickel toxicity in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **82**: 1291-300
- Macomber L & Hausinger RP (2011) Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics* **3**: 1153-62
- Maier RJ, Benoit SL & Seshadri S (2007) Nickel-binding and accessory proteins facilitating Ni-enzyme maturation in *Helicobacter pylori*. *Biometals* **20**: 655-664

- Maier RJ, Olson JW & Olczak A (2003) Hydrogen-oxidizing capabilities of *Helicobacter hepaticus* and in vivo availability of the substrate. *Journal of bacteriology* **185**: 2680
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton JC, Axon ATR, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM & Kuipers EJ (2012) Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* **61**: 646-664
- Marshall BJ & Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **16**: 1311-5
- Massé E, Vanderpool CK, Gottesman S & Masse E (2005) Effect of RyhB Small RNA on Global Iron Use in *Escherichia coli* Effect of RyhB Small RNA on Global Iron Use in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **187**: 6992-71
- Mateos LM, Ordonez E, Letek M & Gil JA (2006) *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *International Microbiology* **9**: 207-215
- McGovern KJ, Blanchard TG, Gutierrez JA, Czinn SJ, Krakowka S & Youngman P (2001) gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infection and immunity* **69**: 4168-73
- Mehta N, Olson JW & Maier RJ (2003) Characterization of *Helicobacter pylori* Nickel Metabolism Accessory Proteins Needed for Maturation of both Urease and Hydrogenase. *Journal of bacteriology* **185**: 726-734
- Mendz GL & Hazell SL (1995) Aminoacid utilization by *Helicobacter pylori*. *The international journal of biochemistry & cell biology* **27**: 1085-93
- Mendz GL & Hazell SL (1996) The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **142** (Pt 1): 2959-67
- Merrell DS, Goodrich ML, Otto G, Tompkins LS & Falkow S (2003) pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity* **71**: 3529-3539
- Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M & Pahl HL (2000) *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *The Journal of biological chemistry* **275**: 16064-72
- Mobley HLT, Garner RM & Bauerfeind P (1995a) *Helicobacter pylori* nickel-transport gene nixA: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Molecular Microbiology* **16**: 97-109
- Mobley HLT, Garner RM, Chippendale GR, Gilbert JV, Kane a V & Plaut a G (1999) Role of Hpn and NixA of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to bismuth and other metal ions. *Helicobacter* **4**: 162-9
- Mobley HLT, Island MD & Hausinger RP (1995b) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological reviews* **59**: 451-80
- Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A & Montecucco C (1998) Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *The Journal of experimental medicine* **187**: 135-40
- Mulhardt C (2006) Molecular Biology and Genomics 1st ed. Academic Press
- Muller C, Bahlawane C, Aubert S, Delay CM, Schauer K, Michaud-Soret I & De Reuse H (2011) Hierarchical regulation of the NikR-mediated nickel response in *Helicobacter pylori*. *Nucleic acids research* **39**: 7564-75
- Muotiala A, Helander IM, Pyhala L, Kosunen TU & Morant AP (1992) Low Biological Activity of *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* **60**: 1714-1716
- Müller A & Solnick JV (2011) Inflammation , Immunity , and Vaccine Development for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **16**: 26-32
- Nakamura A, Yao M, Chimnaronk S, Sakai N & Tanaka I (2006) Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB. *Science (New York, N.Y.)* **312**: 1954-8
- Nakamura E & Hagen SJ (2002) Role of glutamine and arginase in protection against ammonia-induced cell death in gastric epithelial cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **283**: G1264-75
- Nakayama M, Kimura M, Wada A, Yahiro K, Ogushi K-ichi, Niidome T, Fujikawa A, Shirasaka D, Aoyama N, Kurazono H, Noda M, Moss J & Hirayama T (2004) *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *The Journal of biological chemistry* **279**: 7024-8
- Nath G (2010) Role of bacteria in carcinogenesis, with special reference to carcinoma of the gallbladder. *World Journal of Gastroenterology* **16**: 5395
- Navarro C, Wu L-F & Mandrand-Berthelot M-A (1993) The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependant transport system for nickel. *Molecular microbiology* **9**: 1181-1191

- Nguyen VB, Nguyen GK, Phung DC, Okrainec K, Raymond J, Dupond C, Kremp O, Kalach N & Vidal-Trecan G (2006) Intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* infection in children of households with multiple generations in Vietnam. *European journal of epidemiology* **21**: 459-63
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* **27**: 313-39
- Nilius M, Ströhle A, Bode G & Malfertheiner P (1993) Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* **280**: 259-72
- Nolan KJ, Mcgee DJ, Mitchell HM, Harro JM, Rourke JO, John E, Danon SJ, Moss ND, Harry LT, Lee A, Kolesnikow T, Wilson JE & Mobley HLT (2002) In Vivo Behavior of a *Helicobacter pylori* SS1 nixA Mutant with Reduced Urease Activity. *Infection and immunity* **70**: 685-691
- Nomura AMY, Pérez-Pérez GI, Lee J, Stemmermann G & Blaser MJ (2002) Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. *American journal of epidemiology* **155**: 1054-9
- Van Nostrand JD, Arthur JM, Kilpatrick LE, Neely BA, Bertsch PM & Morris PJ (2008) Changes in protein expression in *Burkholderia vietnamiensis* PRI 301 at pH 5 and 7 with and without nickel. *Microbiology* **154**: 3813-24
- Olson JW, Agar JN, Johnson MK & Maier RJ (2000) Characterization of the NifU and NifS Fe-S cluster formation proteins essential for viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* **39**: 16213-9
- Olson JW & Maier RJ (2002) Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science (New York, N.Y.)* **298**: 1788-90
- Olson JW, Mehta N & Maier RJ (2001) Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Molecular microbiology* **39**: 176-82
- Osman D & Cavet JS (2008) Copper homeostasis in bacteria. *Advances in applied microbiology* **65**: 217-47
- Ottemann KM & Lowenthal AC (2002) *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infection and immunity* **70**: 1984-90
- Outten FW, Djaman O & Storz G (2004) A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **52**: 861-72
- O'Toole PW, Snelling WJ, Canchaya C, Forde BM, Hardie KR, Josenhans C, Graham RL, McMullan G, Parkhill J, Belda E & Bentley SD (2010) Comparative genomics and proteomics of *Helicobacter mustelae*, an ulcerogenic and carcinogenic gastric pathogen. *BMC genomics* **11**: 164
- Palli D, Saieva C, Gemma S, Masala G, Gomez-Miguel MJ, Luzzi I, D'Errico M, Matullo G, Ozzola G, Manetti R, Nesi G, Sera F, Zanna I, Dogliotti E & Testai E (2005) GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms and gastric cancer in a high-risk Italian population. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **115**: 284-9
- Papalexis V, Siomos M a, Campanale N, Guo X, Kocak G, Foley M & Tilley L (2001) Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Molecular and biochemical parasitology* **115**: 77-86
- Papini E, Satin B, Norais N, de Bernard M, Telford JL, Rappuoli R & Montecucco C (1998) Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *The journal of clinical investigation* **102**: 813-20
- Pardee AB & Prestidge LS (1959) On the nature of the repressor of beta-galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **36**: 545-547
- Parsonnet J, Shmueli H & Haggerty T (1999) Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA: the journal of the American Medical Association* **282**: 2240-5
- Perez-Perez GI, Dworkin BM, Chodos JE & Blaser MJ (1988) *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Annals of internal medicine* **109**: 11-7
- Phadnis SH, Parlow MH, Levy M, Ilver D, Caulkins CM, Connors JB & Dunn BE (1996) Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infection and immunity* **64**: 905-12
- Pina KD, Desjardin V, Giordano G, Wu L-fei & Pina KDE (1999) Isolation and Characterization of the nikR Gene Encoding a Nickel-Responsive Regulator in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **181**: 670-674
- Polk DB & Peek RM (2010) *Helicobacter pylori*. gastric cancer and beyond. *Nature reviews. Cancer* **10**: 403-14
- Portal-Celhay C & Perez-Perez GI (2006) Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clinical science* **110**: 305-14
- Porter SL, Wadhams GH & Armitage JP (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature reviews. Microbiology* **9**: 153-65

- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M & Séraphin B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods (San Diego, Calif.)* **24**: 218-29
- Py B & Barras F (2010) Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nature reviews. Microbiology* **8**: 436-46
- RCSB (2001) Crystal structure of *Helicobacter pylori* urease. *Protein Data Bank* Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1E9Z> [Accessed May 17, 2012]
- Radford SE (2006) GroEL: More than Just a folding cage. *Cell* **125**: 831-3
- Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, Lenzen G, Petel F, Wojcik J, Schächter V, Chemama Y, Labigne a & Legrain P (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**: 211-5
- Raymond J, Lamarque D, Kalach N, Chaussade S & Burucoa C (2010) High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. *Helicobacter* **15**: 21-7
- Reibman J, Marmor M, Filner J, Fernandez-Beros M-E, Rogers L, Perez-Perez GI & Blaser MJ (2008) Asthma is inversely associated with *Helicobacter pylori* status in an urban population. *PloS one* **3**: e4060
- Reitzer LJ (1996) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Riley M, Schaechter M & Umberger HE (eds) pp 391-407. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press
- Reynolds DJ & Penn CW (1994) Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology (Reading, England)* **140** (Pt 1): 2649-56
- Rodionov DA, Hebbeln P, Gelfand MS & Eitinger T (2006) Comparative and Functional Genomic Analysis of Prokaryotic Nickel and Cobalt Uptake Transporters: Evidence for a Novel Group of ATP-Binding Cassette Transporters. *Journal of bacteriology* **188**: 317-327
- Rodrigue A, Effantin G & Mandrand-Berthelot M-A (2005) Identification of rcnA (yohM), a Nickel and Cobalt Resistance Gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **187**: 2912-6
- Rolig AS, Shanks J, Carter JE & Ottemann KM (2012) *Helicobacter pylori* requires TlpD-driven chemotaxis to proliferate in the antrum. *Infection and immunity*
- Ross C a & Poirier M a (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**: 891-8
- Rousselot-Pailley P, Bochot C, Marchi-Delapierre C, Jorge-Robin A, Martin L, Fontecilla-Camps JC, Cavazza C & Ménage S (2009) The protein environment drives selectivity for sulfide oxidation by an artificial metalloenzyme. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* **10**: 545-52
- Rowinska-Zyrek M, Witkowska D, Bielinska S, Kamysz W & Kozlowski H (2011) The -Cys-Cys- motif in *Helicobacter pylori*'s Hpn and HspA proteins is an essential anchoring site for metal ions. *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)* **40**: 5604-10
- Réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (2001) Surveillance du milieu marin Nantes
- Sachs G & Scott DR (2012) *Helicobacter pylori*: Eradication or Preservation. *FI000 medicine reports* **4**: 7
- Sachs G, Weeks DDL, Wen Y, Marcus EE a, DR, Scott DR & Melchers K (2005) Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology* **20**: 429-438
- Saha R, Saha N, Donofrio RS & Bestervelt LL (2012) Microbial siderophores: a mini review. *Journal of basic microbiology*: 1-15
- Saito Y, Murata-Kamiya N, Hirayama T, Ohba Y & Hatakeyama M (2010) Conversion of *Helicobacter pylori* CagA from senescence inducer to oncogenic driver through polarity-dependent regulation of p21. *The Journal of experimental medicine* **207**: 2157-74
- Salama NR, Otto G, Tompkins L & Falkow S (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infection and immunity* **69**: 730-6
- Salama NR, Shepherd B & Falkow S (2004) Global Transposon Mutagenesis and Essential Gene Analysis of *Helicobacter pylori* Global Transposon Mutagenesis and Essential Gene Analysis of *Helicobacter pylori* †. *Journal of bacteriology* **186**: 7926-7935
- Saleem A, Qasim A, O'Connor HJ & O'Morain C a (2009) Pylera for the eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Expert review of anti-infective therapy* **7**: 793-9
- Sayi A, Kohler E, Toller IM, Flavell R a, Müller W, Roers A & Müller A (2011) TLR-2-activated B cells suppress *Helicobacter*-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **186**: 878-90

- Schalk IJ, Hannauer M & Braud A (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental microbiology* **13**: 2844-54
- Schauer K (2007) Etude du métabolisme du nickel chez *Helicobacter pylori*. : 116
- Schauer K, Gouget B, Carrière M, Labigne A & de Reuse H (2007) Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Molecular microbiology* **63**: 1054-68
- Schauer K, Muller C, Carrière M, Labigne A, Cavazza C & De Reuse H (2010) The *Helicobacter pylori* GroES cochaperonin HspA functions as a specialized nickel chaperone and sequestration protein through its unique C-terminal extension. *Journal of bacteriology* **192**: 1231-7
- Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Volland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM & Gerhard M (2007) Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* **132**: 1820-33
- Schmitt W & Haas R (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Molecular microbiology* **12**: 307-19
- Schram SE, Warshaw EM & Laumann A (2010) Nickel hypersensitivity: a clinical review and call to action. *International journal of dermatology* **49**: 115-25
- Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling H-O, Josenhans C & Suerbaum S (2004) The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 5024-9
- Schreiter ER, Sintchak MD, Guo Y, Chivers PT, Sauer RT & Drennan CL (2003) Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nature structural biology* **10**: 794-9
- Schreiter ER, Wang SC, Zamble DB & Drennan CL (2006) NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13676-81
- Schön A, Hottinger H & Söll D (1988) Misaminoacylation and transamidation are required for protein biosynthesis in *Lactobacillus bulgaricus*. *Biochimie* **70**: 391-4
- Scott DR, Marcus E a, Weeks DL, Lee a, Melchers K & Sachs G (2000) Expression of the *Helicobacter pylori* urel gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. *Infection and immunity* **68**: 470-7
- Scott DR, Marcus E a, Wen Y, Singh S, Feng J & Sachs G (2010) Cytoplasmic histidine kinase (HP0244)-regulated assembly of urease with Urel, a channel for urea and its metabolites, CO₂, NH₃, and NH₄(+), is necessary for acid survival of *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology* **192**: 94-103
- Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF & Backert S (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **277**: 6775-8
- Senkovich OA, Yin J, Ekshyyan V, Conant C, Traylor J, Adegboyega P, McGee DJ, Rhoads RE, Slepnev S & Testerman TL (2011) *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. *Infection and immunity* **79**: 3106-16
- Seshadri S, Benoit SL & Maier RJ (2007) Roles of His-rich hpn and hpn-like proteins in *Helicobacter pylori* nickel physiology. *Journal of bacteriology* **189**: 4120-6
- Sheu B-s, Sheu S-m, Yang H-b, Huang A-h & Wu J-j (2003) Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in babA2 genopositive infection. *Gut* **52**: 927-932
- Shi R, Munger C, Asinas A, Benoit SL, Miller E, Matte A, Maier RJ & Cygler M (2010) Crystal structures of apo and metal-bound forms of the UreE protein from *Helicobacter pylori*: role of multiple metal binding sites. *Biochemistry* **49**: 7080-8
- Shi W, Dunbar J, Jayasekera MMK, Viola RE & Farber GK (1997) The Structure of L-Aspartate Ammonia-Lyase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**: 9136-9144
- Shibayama K, Kamachi K, Nagata N, Yagi T, Nada T, Doi Y, Shibata N, Yokoyama K, Yamane K, Kato H, Iinuma Y & Arakawa Y (2003) A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology* **47**: 443-451
- Shibayama K, Wachino J-ichi, Arakawa Y, Saidijam M, Rutherford NG & Henderson PJF (2007) Metabolism of glutamine and glutathione via gamma-glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism. *Molecular microbiology* **64**: 396-406
- Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K & M (2003) Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nature genetics* **33**: 5-12

- Siburt CJP, Roulhac PL, Weaver KD, Noto JM, Mietzner TA, Cornelissen CN, Fitzgerald MC & Crumbliss AL (2009) Hijacking transferrin bound iron: protein-receptor interactions involved in iron transport in *N. gonorrhoeae*. *Metallomics: integrated biometal science* **1**: 249-55
- Skoog EC, Sjöling A, Navabi N, Holgersson J, Lundin SB & Lindén SK (2012) Human Gastric Mucins Differently Regulate *Helicobacter pylori* Proliferation, Gene Expression and Interactions with Host Cells. *PloS one* **7**: e36378
- Skouloubris S, Labigne A & De Reuse H (2001) The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues. *Molecular microbiology* **40**: 596-609
- Skouloubris S, Thiberge JMM, Labigne A & De Reuse H (1998) The *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infection and immunity* **66**: 4517
- Smet A, Flahou B, Mukhopadhyay I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F & Hold GL (2011) The Other *Helicobacters*. *Helicobacter* **16**: 70-75
- Smythies LE, Waites KB, Lindsey JR, Harris PR, Ghiara P & Smith PD (2000) *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN- γ , gene-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **165**: 1022-9
- Soriano A & Hausinger RP (1999) GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 11140-4
- Srere PA (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annual review of biochemistry* **56**: 89-124
- Stark RM, Suleiman M-S, Hassan IJ, Greenman J & Millar MR (1997) Amino acid utilisation and deamination of glutamine and asparagine by *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology* **46**: 793-800
- Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ & Covacci A (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular microbiology* **43**: 971-80
- Stingl K & De Reuse H (2005) Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity? *International journal of medical microbiology: IJMM* **295**: 307-15
- Stingl K, Schauer K, Ecobichon C, Labigne A, Lenormand P, Rousselle JCJ-C, Namane A & de Reuse H (2008) In vivo interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**: 2429-2441
- Stingl K, Uhlemann EM, Schmid R, Altendorf K & Bakker EP (2002) Energetics of *Helicobacter pylori* and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1. *Journal of bacteriology* **184**: 3053-3060
- Stähler FN, Odenbreit S, Haas R, Wilrich J, Van Vliet AHM, Kusters JG, Kist M & Bereswill S (2006) The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. *Infection and immunity* **74**: 3845-52
- Suerbaum S & Michetti P (2002) *Helicobacter pylori* infection. *The New England journal of medicine* **347**: 1175-86
- Suerbaum S, Thiberge J-M, Kansau I, Ferrero RL & Labigne A (1994) *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Molecular microbiology* **14**: 959-74
- Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D & Cover TL (2004) Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 7727-32
- Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Hirayama T & Ra C (2002) Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *Journal of immunology* **168**: 2603-7
- Sydor AM, Liu J & Zamble DB (2011) Effects of metal on the biochemical properties of *Helicobacter pylori* HypB, a maturation factor of [NiFe]-hydrogenase and urease. *Journal of bacteriology* **193**: 1359-68
- Takahashi Y & Tokumoto U (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *The Journal of biological chemistry* **277**: 28380-3
- Talarico S, Whitefield SE, Fero J, Haas R & Salama NR (2012) Regulation of *Helicobacter pylori* adherence by gene conversion. *Molecular microbiology* **Epub**:
- Tegtmeyer N, Wessler S & Backert S (2011a) Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *The FEBS journal* **278**: 1190-202

- Tegtmeyer N, Wittelsberger R, Hartig R, Wessler S, Martinez-Quiles N & Backert S (2011b) Serine phosphorylation of cortactin controls focal adhesion kinase activity and cell scattering induced by *Helicobacter pylori*. *Cell host & microbe* **9**: 520-31
- Terry K, Williams SM, Connolly L & Ottemann KM (2005) Chemotaxis plays multiple roles during *Helicobacter pylori* animal infection. *Infection and immunity* **73**: 803-11
- Testerman TL, Conn PB, Mobley HLT & McGee DJ (2006) Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. *Journal of clinical microbiology* **44**: 1650-1658
- Testerman TL, McGee DJ & Mobley HLT (2001) Chapter 34: Adherence and Colonization. In *Helicobacter pylori Physiology and Genetics* ASM Press
- Teyssou R (2009) Histoire de l'ulcère gastro-duodénal: Le pourquoi et le comment L'Harmattan
- Thoden JB, Holden HM, Wesenberg G, Raushel FM & Rayment I (1997) Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product. *Biochemistry* **36**: 6305-16
- Tokumoto U, Kitamura S, Fukuyama K & Takahashi Y (2004) Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the isc and suf operons in *Escherichia coli* with the nifSU-like operon from *Helicobacter pylori*. *Journal of biochemistry* **136**: 199-209
- Tokumoto U & Takahashi Y (2001) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *Journal of biochemistry* **130**: 63-71
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA & others (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547
- Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M & Papini E (2001) The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *Journal of Clinical Investigation* **108**: 929-937
- Touati D, Jacques M, Tardat B, Bouchard L & Despied S (1995) Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *Journal of bacteriology* **177**: 2305-14
- Touati E (2010) When bacteria become mutagenic and carcinogenic: Lessons from *H. pylori*. *Mutation research* **703**: 66-70
- Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K & Nakazawa T (1994) A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infection and immunity* **62**: 3586-9
- Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Ito T, Nagano K, Sasaki Y, Hayashi N, Fusamoto H & Kamada T (1993) Cell kinetics of mucosal atrophy in rat stomach induced by long-term administration of ammonia. *Gastroenterology* **104**: 796-801
- Vaira D, Zullo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, Hassan C, Bernabucci V, Tampieri A & Morini S (2007) Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. *Annals of internal medicine* **146**: 556-63
- Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ & Ferrero RL (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature immunology* **5**: 1166-74
- Waldron KJ & Robinson NJ (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature reviews. Microbiology* **7**: 25-35
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D & Robinson NJ (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**: 823-30
- Watt RK & Ludden PW (1998) The Identification, Purification, and Characterization of CooJ. *The Journal of biological chemistry* **273**: 10019-10025
- Wen S & Moss SF (2009) *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer letters* **282**: 1-8
- Wen Y, Marcus EA, Matrubutham U, Gleeson MA, Scott DR & Sachs G (2003) Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* **71**: 5921
- West AL, Evans SE, González JM, Carter LG, Tsuruta H, Pozharski E & Michel SLJ (2012) Ni(II) coordination to mixed sites modulates DNA binding of HpNikR via a long-range effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 5633-8
- West AL, St John F, Lopes PEM, MacKerell AD, Pozharski E & Michel SLJ (2010) Holo-Ni(II)HpNikR is an asymmetric tetramer containing two different nickel-binding sites. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 14447-56

- White RJ, Margolis PS, Trias J & Yuan Z (2003) Targeting metalloenzymes: a strategy that works. *Current Opinion in Pharmacology* **3**: 502-507
- Wiesner J & Vilcinskas A (2010) Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* **1**: 440-64
- Winkelmann G (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society transactions* **30**: 691-6
- Wirth HP, Beins MH, Yang M, Tham KT & Blaser MJ (1998) Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infection and immunity* **66**: 4856-66
- Witkowska D, Bielinska S, Kamysz W & Kozlowski H (2011) Cu²⁺ and Ni²⁺ interactions with N-terminal fragments of Hpn and Hpn-like proteins from *Helicobacter pylori*. Unusual impact of poly-Gln sequence on the complex stability. *Journal of inorganic biochemistry* **105**: 208-14
- Witkowska D, Rowinska-Zyrek M, Valensin G & Kozlowski H (2012a) Specific poly-histidyl and poly-cysteine protein sites involved in Ni²⁺ homeostasis in *Helicobacter pylori*. Impact of Bi³⁺ ions on Ni²⁺ binding to proteins. Structural and thermodynamic aspects. *Coordination Chemistry Reviews* **256**: 133-148
- Witkowska D, Valensin D, Rowinska-Zyrek M, Karafova A, Kamysz W & Kozlowski H (2012b) Coordination of Ni²⁺ and Cu²⁺ to metal ion binding domains of *E. coli* SlyD protein. *Journal of inorganic biochemistry* **107**: 73-81
- Wood JM (2007) Bacterial osmosensing transporters. *Methods in enzymology* **428**: 77-107
- Wülfing C, Lombardero J & Plückthun A (1994) An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *The Journal of biological chemistry* **269**: 2895-901
- Wüstner S, Bolz C, Rath E, Haller D & Gerhard M (2012) *Helicobacter* gamma-glutamyltranspeptidase inhibits T cell proliferation via glutamine depletion. In *10th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections*, European Study Group on Pathogenesis and Immunology in *Helicobacter* Infections and European *Helicobacter* Study Group (ed) Helsingør, Denmark
- Xia W, Li H, Sze K-H & Sun H (2009) Structure of a nickel chaperone, HypA, from *Helicobacter pylori* reveals two distinct metal binding sites. *Journal of the American Chemical Society* **131**: 10031-40
- Xia W, Li H, Yang X, Wong K-B & Sun H (2012) Metallo-GTPase HypB from *Helicobacter pylori* and its interaction with nickel chaperone protein HypA. *The Journal of biological chemistry* **287**: 6753-63
- Yamaji Y, Watabe H, Yoshida H, Kawabe T, Wada R, Mitsushima T & Omata M (2009) High-risk Population for Gastric Cancer Development Based on Serum Pepsinogen Status and Lifestyle Factors. *Helicobacter* **14**: 81-86
- Yamaoka Y (2010) Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature reviews. Gastroenterology and hepatology* **7**: 629-641
- Yamashita MM, Almassy RJ, Janson C a, Cascio D & Eisenberg D (1989) Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *The Journal of biological chemistry* **264**: 17681-90
- Yoshiyama H, Nakamura H, Kimoto M, Okita K & Nakazawa T (1999) Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Journal of gastroenterology* **34 Suppl 1**: 18-23
- Yu J, Leung WK, Go MY, Chan MCW, To KF, Ng EKW, Chan FKL, Ling TKW, Chung SCS, Sung JJY & Pylori H (2002) Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut* **51**: 480-4
- Zambelli B, Danielli A, Romagnoli S, Neyroz P, Ciurli S & Scarlato V (2008) High-affinity Ni²⁺ binding selectively promotes binding of *Helicobacter pylori* NikR to its target urease promoter. *Journal of molecular biology* **383**: 1129-43
- Zambelli B, Musiani F, Benini S & Ciurli S (2011) Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis. *Accounts of chemical research* **44**: 520-530
- Zanotti G & Cendron L (2010) Functional and structural aspects of *Helicobacter pylori* acidic stress response factors. *IUBMB life* **62**: 715-23
- Zeng Y-B, Zhang D-M, Li H & Sun H (2008) Binding of Ni²⁺ to a histidine- and glutamine-rich protein, Hpn-like. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **13**: 1121-31
- Zheng P-Y & Jones NL (2003) *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cellular microbiology* **5**: 25-40

- Zhou W, Zhang Y, Ding X, Liu Y, Shen F, Zhang X, Deng S, Xiao H, Yang G & Peng H (2012) Magnetotactic bacteria: promising biosorbents for heavy metals. *Applied microbiology and biotechnology*
- Zullo A, De Francesco V, Hassan C, Morini S & Vaira D (2007) The sequential therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication: a pooled-data analysis. *Gut* **56**: 1353-7

Annexes

Article publié dans *Eukaryotic Cell* le 28 mars 2008

The Asexual Yeast *Candida glabrata* Maintains Distinct *a* and *α* Haploid Mating Types
Muller Héloïse, Hennequin Christophe, Gallaud Julien, Dujon Bernard, Fairhead Cécile

Eukaryot Cell. 2008 May;7(5):848-58. Epub 2008 Mar 28.

Erratum in: Eukaryot Cell. 2010 Apr;9(4):671-2

Travail réalisé au cours de ma première année de Master de Biologie Moléculaire et Cellulaire à l'Université Pierre et Marie Curie – Paris 6 lors d'un stage au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie de l'Hôpital Saint-Antoine, en collaboration avec l'Unité de Génétique Moléculaire des Levures de l'Institut Pasteur.

The Asexual Yeast *Candida glabrata* Maintains Distinct α and α Haploid Mating Types[†]

Héloïse Muller,^{1*} Christophe Hennequin,² Julien Gallaud,² Bernard Dujon,¹ and Cécile Fairhead¹

Institut Pasteur, Unité de Génétique Moléculaire des Levures, CNRS URA 2171, Université Pierre et Marie Curie—Paris 6 UFR927, F75015 Paris, France,¹ and Université Pierre et Marie Curie—Paris 6 UMR5511, INSERM, Faculté de Médecine St-Antoine, Parasitologie-Mycologie, F75012 Paris, France²

Received 20 December 2007/Accepted 8 March 2008

The genome of the type strain of *Candida glabrata* (CBS138, ATCC 2001) contains homologs of most of the genes involved in mating in *Saccharomyces cerevisiae*, starting with the mating pheromone and receptor genes. Only haploid cells are ever isolated, but *C. glabrata* strains of both mating types are commonly found, the type strain being *MAT α* and most other strains, such as BG2, being *MAT α* . No sexual cycle has been documented for this species. In order to understand which steps of the mating pathway are defective, we have analyzed the expression of homologs of some of the key genes involved as well as the production of mating pheromones and the organism's sensitivity to artificial pheromones. We show that cells of opposite mating types express both pheromone receptor genes and are insensitive to pheromones. Nonetheless, cells maintain specificity through regulation of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes and, more surprisingly, through differential splicing of the *a1* transcript.

The comparative study of reproductive cycles in fungi reveals varied and often surprising situations. Even quite closely related species, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida glabrata*, exhibit very different modes of reproduction; the former is a self-fertile, fully sexual species, while the latter has no apparent sexual phase and reproduces clonally. "*Candida*" species that lack a teleomorph are distributed over the whole hemiascomycete phylogenetic tree (15), illustrating both the plasticity of the trait observed and the lack of simple relationships between taxonomic nomenclature and phylogenomics.

The type strain of *Candida glabrata*, CBS138, was sequenced in 2004 through the Genolevures 2 sequencing effort that included four hemiascomycetes of various degrees of relatedness to the model yeast *S. cerevisiae* (6). This confirmed that asexual *C. glabrata* is phylogenetically very distant from *Candida albicans* and close to *S. cerevisiae*. Because of the relatedness of *C. glabrata* to the extensively studied model yeast, we have examined whether known mating pathways from *S. cerevisiae* exist in *C. glabrata*.

In *S. cerevisiae*, the *MAT* locus encodes master transcription factors that regulate three categories of genes: α -specific genes, α -specific genes, and haploidy-specific genes, involved in pheromone expression and sensing, the transduction cascade, and the inhibition of meiosis, respectively (12, 13). The *S. cerevisiae* genome also contains two additional loci, *HML* and *HMR*, harboring, respectively, the α and α genetic information, which are transcriptionally silenced.

Many genes involved in mating are conserved between the two species (26, 31); in particular, the *MAT* cassettes and the *MAT*-

like cassettes (*HML α* and *HMR α* homologs) have the same overall structure and encode the same proteins in both yeasts. A notable difference is that in *S. cerevisiae*, the three cassettes are on the same chromosome, whereas in *C. glabrata*, *MAT* and the *HML*-like cassette are on chromosome II and the *HMR*-like cassette is on chromosome V (7). Cassettes are also inverted with respect to the telomeres between the two species, and examination of other yeasts has shown that the inversion took place in *S. cerevisiae* (20).

In this work, we show that there are several apparent defects in the mating pathway of *C. glabrata* compared to *S. cerevisiae*. Cells, nonetheless, maintain some mating type identity through differential expression of α genes and, more surprisingly, differential splicing of the *a1* transcript.

MATERIALS AND METHODS

Yeast media. YPD medium was prepared with 1% (wt/vol) Bacto peptone (Difco), 1% (wt/vol) Bacto yeast extract (Difco), 2% (wt/vol) glucose, and 2% (wt/vol) Bacto agar, when needed. Selective SC medium was prepared with 2% (wt/vol) glucose, 2% (wt/vol) Bacto agar, and 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco) but supplemented with a mix of all amino acids, uracil, and adenine, with omission of nutrients whose prototrophy was selected for, when needed. WO medium was prepared with 0.67% (wt/vol) yeast nitrogen base without amino acids (Difco), 2% (wt/vol) glucose, and 2% (wt/vol) Bacto agar. SPO medium contained 0.25% (wt/vol) Bacto yeast extract (Difco), 1% KO acetate, 0.1% (wt/vol) glucose, and 2% (wt/vol) Bacto agar. Gorodkova medium was prepared with 1% (wt/vol) Bacto peptone (Difco), 0.5% NaCl, 0.1% (wt/vol) glucose, and 2% (wt/vol) Bacto agar. SLAD medium was prepared with 0.17% (wt/vol) yeast nitrogen base without amino acids (Difco), 2% (wt/vol) glucose, and 2% (wt/vol) Bacto agar. McClary's acetate medium was prepared with 0.25% (wt/vol) Bacto yeast extract (Difco), 0.98% (wt/vol) potassium acetate, 0.07% (wt/vol) MgSO₄, 0.1% (wt/vol) glucose, and 1.5% (wt/vol) Bacto agar. V8 medium was prepared with 20% (vol/vol) V8 juice, 0.3% (wt/vol) CaCO₃, and 1.5% (wt/vol) Bacto agar, and its pH was adjusted to 6.8 or 5.5 with NaOH. Bacto potato dextrose agar (Difco) medium contained 20% (vol/vol) potato infusion, 2% (wt/vol) glucose, and 1.5% Bacto agar. Malt (Difco) medium contained 3% (wt/vol) malt extract and 1.5% (wt/vol) Bacto agar.

Yeast strains. Strains are described in Table 1. Deletion mutants of *C. glabrata* were obtained by cotransformation of the split-marker vectors (8) pKA, pAN (for the construction of the *ura3* strain HM100a from wild-type CBS138), pUR,

* Corresponding author. Mailing address: Unité de Génétique Moléculaire des Levures (URA 2171 CNRS, UFR 927 Université Pierre et Marie Curie), Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France. Phone: 33-1-40 61 30 59. Fax: 33-1-40 61 34 56. E-mail: hmuller@pasteur.fr.

[†] Published ahead of print on 28 March 2008.

TABLE 1. Descriptions of strains used in this work

Species	Strain	Description	Parent strain	Genotype ^a	Reference or source ^b
<i>S. cerevisiae</i>	FY23			<i>MATα ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Winston et al. (30)
	FY73			<i>MATα ura3-52 his3Δ200</i>	Winston et al. (30)
	FY1679	FY23 \times FY73		<i>MATα/α ura3-52/ura3-52 trp1Δ63/+ leu2Δ1/+ his3Δ200/+</i>	Thierry et al. (27)
	J5	HO ⁺		<i>HMLα MATα HMRα HO leu2 his4 thr4 lys2</i>	Kindly donated to us by Amar Klar
	BY1408	<i>sst1Δ a</i>	BY4741	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 sst1Δ::KANMX</i>	Euroscarf collection
	BY11408	<i>sst1Δ α</i>	BY4742	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 sst1Δ::KANMX</i>	Euroscarf collection
	BY6055	<i>sst2Δ a</i>	BY4741	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 sst2Δ::KANMX</i>	Euroscarf collection
	BY16055	<i>sst2Δ α</i>	BY4742	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 sst2Δ::KANMX</i>	Euroscarf collection
	BY5645	<i>ste2Δ a</i>	BY4741	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ste2Δ::KANMX</i>	Euroscarf collection
<i>C. glabrata</i>	CBS138	Wild type		<i>MATα</i>	Reference strain (ATCC 2001)
	BG2	Wild type		<i>MATα</i>	Fidel et al. (9)
	Δ H1	CBS138 <i>his3Δ</i>	2001U	<i>MATα CAGL0I03080gΔ CAGL0L02937gΔ(-254 to +777)::CgURA3</i>	Weig et al. (29)
	M2	Wild type		<i>MATα</i>	Our unpublished data
	M3	Wild type		<i>MATα</i>	Our unpublished data
	M4	Wild type		<i>MATα</i>	Our unpublished data
	M5	Wild type		<i>MATα</i>	Our unpublished data
	HM100a	CBS138 <i>ura3Δ</i>		<i>MATα CAGL0I03080gΔ::KANMX</i>	This work
	HM106a	CBS138 <i>trp1Δ</i>	HM100a	<i>MATα CAGL0I03080gΔ::KANMX CAGL0C04092gΔ::ScURA3</i>	This work
	HM102a	CBS138 <i>HMRΔ</i>	HM100a	<i>MATα CAGL0I03080gΔ::KANMX CgHMRΔ::ScURA3</i>	This work
	HM103a	CBS138 <i>sst2Δ</i>	HM100a	<i>MATα CAGL0I03080gΔ::KANMX CAGL0H00374gΔ::ScURA3</i>	This work
	BG14	BG2 <i>ura3Δ</i>	BG2	<i>MATα CAGL0I03080gΔ(-85 to +932)::Tn903 neo^R</i>	Cormack and Falkow (5)
	HM107a	BG2 <i>trp1Δ</i>	BG14	<i>MATα CAGL0I03080gΔ(-85 to +932)::Tn903 neo^R CAGL0C04092gΔ::ScURA3</i>	This work
	BG87	BG2 <i>ura3Δ his3Δ</i>	BG14	<i>MATα CAGL0L02937gΔ(1 to +631) CAGL0I03080gΔ(-85 to +932)::Tn903 neo^R</i>	Cormack and Falkow (5)
	HM104a	BG14 <i>sst2Δ</i>	BG14	<i>MATα CAGL0I03080gΔ(-85 to +932)::Tn903 neo^R CAGL0H00374gΔ::ScURA3</i>	This work
	HM105a	BG87 <i>sst2Δ</i>	BG87	<i>MATα CAGL0L02937gΔ(1 to +631) CAGL0I03080gΔ(-85 to +932)::Tn903 neo^R sst2Δ::ScURA3</i>	This work

^a An Sc prefix on a gene indicates *S. cerevisiae*; a Cg prefix indicates *C. glabrata*.

^b Our unpublished data, data of H. Muller, C. Hennequin, B. Dujon, and C. Fairhead.

and pRA (for the construction of *HMR* and *sst2* deletants of *ura3* strains), in which appropriate PCR fragments upstream and downstream of the targeted gene were cloned into the BamHI/KpnI sites. Constructions were controlled by Southern blot analysis (data not shown).

Mating assays. Cells from strains of opposite mating types were grown as patches on complete medium plates, collected, and mixed in a patch on plates with various media. After 4 days at 30°C, cells were collected and streaked on WO medium plates and incubated at 30°C. Plates were examined regularly during 1 week, and potential diploid cells were streaked a second time on WO medium plates.

RNA extraction. RNA from *C. glabrata* and *S. cerevisiae* was prepared as described previously (3), by using hot phenol extraction after glass bead cell lysis of mid-log-phase cultures.

RT-PCR. Four micrograms of total RNA was used per reaction. To avoid any remaining DNA in the preparation, RNAs were first treated with DNase I (RQ1 RNase-free DNase; Promega) and extracted with phenol-chloroform before being subjected to reverse transcription. Reverse transcriptase (RT) Superscript II (catalog no. 18064-014; Invitrogen) was used according to the manufacturer's recommendations. RNasin (Promega) was added to all reaction mixtures to avoid RNA degradation.

qRT-PCR. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) experiments were performed using an Abgene Absolute MAX 2-Step qRT-PCR Sybr green kit. The first step of DNase I and phenol-chloroform extraction was performed as described for the RT-PCR experiments.

DNase-free total RNA (0.8 μ g) was used for reverse transcription to obtain cDNA. qPCR was then performed in triplicate on 10-fold dilutions of the cDNA

solution. Standard curves were obtained by PCR with serial dilutions of DNA of known concentrations. In each well, 12.5 μ l of Sybr green was added to 5 μ l (~10 ng) of cDNA or DNA and 8 pmol of the two specific primers (Table 2) in a final volume of 25 μ l. Specific primers for each gene were designed using the Beacon Designer software, v. 4.

The PCR program was 14 min at 95°C for initial denaturation and enzyme activation followed by 40 cycles of denaturation (30 s at 95°C) and of hybridization/elongation (30 s at 55°C), and a final step of 1 min at 95°C. The melting curve started at 55°C with 0.5°C increments every 10 s for 80 cycles. qPCRs were run on an iQ5 real-time PCR detection system (Bio-Rad) and analyzed with the iCycler software.

Sensitivity to pheromones and pheromone expression. Synthetic pheromones (Eurogentec SA, Seraing, Belgium, and NeoMPS SA, Strasbourg, France) of *C. glabrata* were synthesized as explained below and in the legend to Fig. 4. For sensitivity assays, 50 μ l of a 200- μ g/ml solution of *C. glabrata* α -factor or α -factor or of *S. cerevisiae* α -factor (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) was spotted on plates with SC medium without tryptophan (SC-W) or SC medium without adenine (SC-ade) and, when dry, covered with a cell lawn containing 5×10^4 cells.

For pheromone expression experiments, cells from *C. glabrata* or *S. cerevisiae* were grown in YPD overnight at 30°C until the end of log phase. Cultures were centrifuged, and supernatants were filtered on 0.22- μ m nitrocellulose. Fifty microliters of filtered medium was then spotted directly on SC medium-W or SC medium-ade plates. After the spot was allowed to dry, 5×10^4 cells of the tester strain were spread on the plate.

Pictures were taken after 2 days of growth at 30°C.

TABLE 2. Description of oligonucleotide primers used in this work

Type of expts	Oligonucleotide name	Sequence (5'-3')	Primer pair target or use
RT-PCR	HM_RT_alpha1_F HM_RT_alpha1_R	CTGTAACTAAACCGAACAA ATGGGCCATTATATAATTAC	$\alpha 1$ of <i>C. glabrata</i>
	HM_RT_a1_F HM_RT_a1_R	GTTTACAGATATTGCAATCG TGTTTAGATCTTTCGATCTCT	$\alpha 1$ of <i>C. glabrata</i>
	HM_RT_act1_F HM_RT_act1_R	GCTGTCTTGTCTCTATACTCC CTAGAATAGAACCACCGATC	<i>ACT1</i> of <i>C. glabrata</i>
	HM_RT_a1Scer_R HM_RT_a1Scer_F	AAACTCTTACTTGAAGTGGAG GGATGATATTGTAGTATGGC	$\alpha 1$ of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_RT_alpha1Scer_F HM_RT_alpha1Scer_R	CTTCAATATTATTCGACCACT CCAAATGTACAAACACATCT	$\alpha 1$ of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YCR097_a1_F HM_YCR097_a1_R	TGTAGTATGGCGGAAAAAC TTGTGTAATGTATGTTGCTC	First intron of $\alpha 1$ of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YCR097_a1Ter_F HM_YCR097_a1Ter_R	AAGAGAAGAGCCCCAAAGG ATTTAGATCTCATACGTTTA	Second intron of $\alpha 1$ of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_CG_a1_F HM_CG_a1_R	GCAATCGGTTAATTCTAATACTC CTGTTTGGGTAAATCTATGTTG	First intron of $\alpha 1$ of <i>C. glabrata</i>
	HM_CG_a1Ter_F HM_CG_a1Ter_R	ATCACCACCAATCAAGTTC TCACGATTGTTTAGATCTTTTC	Second intron of $\alpha 1$ of <i>C. glabrata</i>
qRT-PCR	HM_YCR040_alpha1_F HM_YCR040_alpha1_R	TGTCTTGTCTTCTCTGCTC ATTATTCGTCAACCACTCTAC	$\alpha 1$ of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YCR097_a1Bis_F HM_YCR097_a1Bis_R	AAGAGAAGAGCCCCAAAGG CTTGAAGTGGAGTAATGCC	$\alpha 1$ of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YCR096_a2_F HM_YCR096_a2_R	CAAAAGAAAAATGTCGAATAC TGAATGCGAGATAAACTGG	$\alpha 2$ of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YCR039_alpha2_F HM_YCR039_alpha2_R	ATTTACCTAAGTTACCAGAGAG AGTAGTGAGTTGAGATGTTG	$\alpha 2$ of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YFL026_STE2_F HM_YFL026_STE2_R	AGCACCATTAACACACTTC CCACATCTGACACCAAAC	<i>STE2</i> of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YKL178_STE3_F HM_YKL178_STE3_R	ACAAGTCAGCAATAATAGGG CCGCATCTACAATACACG	<i>STE3</i> of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YDL227_HO_F HM_YDL227_HO_R	GACATTGAAGTTAGAGATTGG ACAGCAGGAGTTACAAGG	<i>HO</i> of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_YFL039_ACT1_F HM_YFL039_ACT1_R	CGCTGCTCAATCTTCTTC AATCTTTTCGTTACCAATAGTG	<i>ACT1</i> of <i>S. cerevisiae</i>
	HM_CG_alpha1_F HM_CG_alpha1_R	ATTAGAGAAGAAAGGATGAAAC GATGGAAGTATTGAAGTGATG	$\alpha 1$ of <i>C. glabrata</i>
	HM_CG_a1Bis_F HM_CG_a1Bis_R	AACATATACAACCTAGGAAGCC TTGAACCTGATTGGTGGTG	$\alpha 1$ of <i>C. glabrata</i>
	HM_CG_a2_F HM_CG_a2_R	GGACCCACAAGAGATAGG CGATAGGAAGCGGCATAG	$\alpha 2$ of <i>C. glabrata</i>
	HM_CG_alpha2_F HM_CG_alpha2_R	TCAAGAATTAGTATTACGCATC AACTGGAACACAATGATATAAG	$\alpha 2$ of <i>C. glabrata</i>
	HM_CG_STE2_F HM_CG_STE2_R	TTGCCATTATCCTCTATCTG ACCCAATTGCTCTTATTCG	<i>STE2</i> of <i>C. glabrata</i>

Continued on following page

TABLE 2—Continued

Type of expts	Oligonucleotide name	Sequence (5'-3')	Primer pair target or use
	HM_CG_STE3_F HM_CG_STE3_R	GTCTTATGTATTGAACGATTGTG CCGAGTGCTGATGGAATG	<i>STE3</i> of <i>C. glabrata</i>
	HM_CG_HO_F HM_CG_HO_R	GCCAAAGAATCATCACAAG GCATCCAGATACTCAAGG	<i>HO</i> of <i>C. glabrata</i>
	HM_CG_ACT1_F HM_CG_ACT1_R	AGTTGCTGCTTTAGTTATTG CTTGGTGTCTTGGTCTAC	<i>ACT1</i> of <i>C. glabrata</i>
Strain construction	HM_CgSST2_pUR_F HM_CgSST2_pUR_R	CGGGATCCTTAAATGATCTGATCCGAGG GGGGTACCAACTGACTCAATACAGCATC	Cloning in pUR for construction of <i>sst2Δ</i> strains HM103a, HM104a, and HM105a
	HM_CgSST2_pRA_F HM_CgSST2_pRA_R	CGGGATCCTTAGGCGGTTTCTTCATATG GGGGTACCAGATTAGACAGAAATCAAGC	Cloning in pRA for construction of <i>sst2Δ</i> strains HM103a, HM104a, and HM105a
	HM_CgHMR_pUR_F HM_CgHMR_pUR_R	CGGGATCCAGGTATGGCTGATGATCAGGA GGGGTACCATTGTTGATTTCCGGGACAA	Cloning in pUR for construction of <i>HMRΔ</i> strain HM102a
	HM_CgHMR_pRA_F HM_CgHMR_pRA_R	CGGGATCCGCTTGCAATCAAAGTGTTCTG GGGGTACCGCCACTACAAATGAGTTTCGTG	Cloning in pRA for construction of <i>HMRΔ</i> strain HM102a
	HM-CgURA3_pKA_F HM-CgURA3_pKA_R	CGGGATCCTTAAAGCTATAGAATCGGCGGGA GGGGTACCAGAAATAACTAAGCTCGCGTGGC	Cloning in pKA for construction of <i>ura3Δ</i> strain HM100a
	HM-CgURA3_pAN_F HM-CgURA3_pAN_R	CGGGATCCGTCATTTTCGGAACAATCCGATT GGGGTACCTTTGAATTCAGCGAGTTAGCGG	Cloning in pAN for construction of <i>ura3Δ</i> strain HM100a

RESULTS

There is no report of the mating of *C. glabrata* in the literature. We have, ourselves, tried mating *MATa* strains descending from BG2 with *MATα* strains descending from CBS138 with different combinations of auxotrophic markers in order to select prototrophic diploid cells, as shown in Table 3. Mating experiments were performed as indicated in Materials and Methods on different media: SPO, V8 at two different pHs, Gorodkova, McClary's acetate, SLAD, malt, Bacto potato dextrose agar, and WO. Subsequent streaking on minimal media never allowed the isolation of prototrophic cells. Since no difference was observed between results with different media and since *C. glabrata* can in fact be considered to be part of the *Saccharomyces* species complex (6), we decided to examine the functionality of genes involved in mating under standard conditions used for *S. cerevisiae*.

TABLE 3. Mating experiments performed^a

<i>MATa</i> parent	Phenotype	<i>MATα</i> parent	Phenotype
BG14	Ura ⁻	HM101a	Leu ⁻
		HM106a	Trp ⁻
		ΔH1	His ⁻
HM107a	Trp ⁻	HM100a	Ura ⁻
		HM101a	Leu ⁻
		ΔH1	His ⁻

^a Ura⁻ BG14 and Trp⁻ HM107a were crossed with the indicated *MATa* parent strains.

Expression of mating type-related genes. In order to address the question of mating type expression by haploid *C. glabrata* cells, we examined the expression of CAGL0E00341g, CAGL0B01243g, and CAGL0B01265g, homologs of the key regulator genes *a1*, *α1*, and *α2*, respectively, at the *MAT* locus. We have not examined the *a2* gene given the absence of any known role for *a2* in either haploid or diploid cells in *S. cerevisiae* and the fact that the gene has no start codon in *C. glabrata*. It has been speculated that *a2* could be a pseudogene of an ancestral gene common to the *S. cerevisiae*-*S. glabrata* branch (10). We also examined the homologs of the mating pheromone receptor-encoding genes that are involved in the initial steps of cellular fusion during mating, CAGL0K12430g, a homolog of *STE2* (YFL026W) encoding the *α*-factor receptor, and CAGL0M08184g, a homolog of *STE3* (YKL178C) encoding the *a*-factor receptor (7). Finally, we examined the expression of the homolog of *HO* (CAGL0G05423g). In *S. cerevisiae*, *HO* is necessary for the completion of the sexual cycle in clonal populations by inducing the formation of cells of opposite mating types within a clone. Since *C. glabrata* infections are usually monoclonal (1), sexual reproduction may depend on the ability of some cells to switch mating types and fuse with related cells.

We performed RT-PCR on *a1* and *α1* genes in three strains of *C. glabrata* of the *α* mating type, CBS138 (sequenced) and M4 and M5 (two isolates from patients), and in three strains of the *a* mating type, BG2 (a commonly used strain in laboratories) and M2 and M3 (two isolates from patients). For the *a1* genes that contain two introns in *S. cerevisiae* and *C. glabrata* (20, 26), primers amplified a fragment containing the first

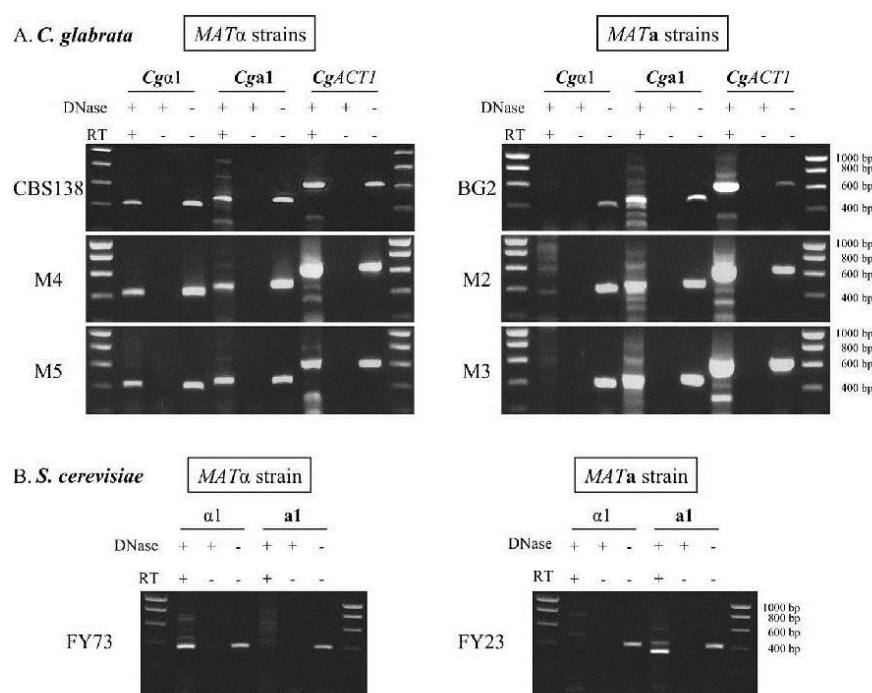


FIG. 1. RT-PCR experiments with *MATα* and *MATα* cassettes of *C. glabrata* (A) and *S. cerevisiae* (B). Mating type is shown at the top, and the gene studied is shown above the gels; for *C. glabrata*, *CgACT1* is CAGL0K12694g, *Cga1* is CAGL0E00341g, and *Cgα1* is CAGL0B01243g. The presence or absence of DNase and RT is indicated by + or –, respectively. Strain names are at the left of gels. Molecular size markers are shown on the right.

intron in *S. cerevisiae* and both introns in *C. glabrata*. In the three independent *C. glabrata* strains of each mating type examined by RT-PCR (Fig. 1A), the *MATα* gene *α1* is expressed in all *MATα* strains and not in *MATα* strains. In contrast, the *a1* gene is expressed in both *MATα* and *MATα* strains. In the latter, this transcript must arise from the expression of the *HMRα* locus, since the *MAT* and *HML* loci contain *α*-type information. We conclude that *HMRα* on chromosome V is not silenced in *C. glabrata*. Thus, the type strain expresses genes from both mating types. Reasoning that this might contribute to its apparent infertility, we constructed a CBS138 *MATα* strain with the *HMRα* locus deleted, strain HM102a. Further analyses include this strain. Control experiments with *S. cerevisiae* show that, as expected, there is clear-cut mating type-specific expression of the *a1* and *α1* genes (Fig. 1B) (13). The size of the major PCR band on cDNA from the *a1* transcript reveals the presence or absence of the splicing of its intron (5). In *S. cerevisiae*, the major band is smaller than the PCR band from genomic DNA, demonstrating splicing of the intron. In *C. glabrata*, despite the presence of multiple bands, the major PCR bands on *a1* cDNAs have the same size as the PCR band from genomic DNA, suggesting a splicing defect. More-explicit experiments on *a1* splicing are described below.

In the qRT-PCR experiments (Fig. 2), we examined the expression of *a1*, *α1*, and *α2* and of *STE2*, *STE3*, and *HO* in *S. cerevisiae* and their homologs in *C. glabrata*. As a standard, we used the actin transcript, estimated to occur at around 10 copies per cell in *S. cerevisiae* (21). Standard *S. cerevisiae*

strains are *ho* mutants, so we included as a control the J5 strain, which contains a wild-type *HO* gene and *α*-type information at *MAT*, *HML*, and *HMR*.

In *C. glabrata*, *a1* is expressed at similar levels in both the *MATα* strain and the *MATα* strain, confirming the results of the above-described RT-PCR experiments. As expected, deletion of the *HMR* cassette in strain HM102a results in the absence of the *a1* transcript (Fig. 2A). Neither *STE2* nor *STE3* homologs display mating type specificity, as they are expressed at similar levels in *MATα* and *MATα* strains. In contrast, the expression of *α1* and *α2* is mating type specific in *C. glabrata*; they are expressed, respectively, 500-fold and 1,200-fold more in *MATα* cells than in *MATα* cells. Deletion of the *HMR* cassette does not interfere with the expression of these two genes. Control experiments show that *a1*, *α1*, *α2*, *STE2*, and *STE3* exhibit mating type-specific expression in *S. cerevisiae* (Fig. 2B). The *HO* gene is transcribed at similar levels in all strains of *C. glabrata* examined and at levels 20-fold lower than in haploid *S. cerevisiae* cells, where around one transcript per 10 cells is observed.

Splicing of *a1* introns. Previous experiments led us to hypothesize that *a1* may be nonfunctional in *C. glabrata*; we observed concomitant expression of *a1*, *α1*, and *α2* in *MATα* cells, a situation that could not occur in *S. cerevisiae* because the *a1*-*α2* heterodimer represses the expression of *a1* and the deletion of *HMRα* in *MATα* cells has no effect on the expression of *α1*, *α2*, *STE2*, and *STE3*. The fact that we observed unspliced forms of *a1* prompted us to examine this in more detail. Indeed, in *S. cerevi-*

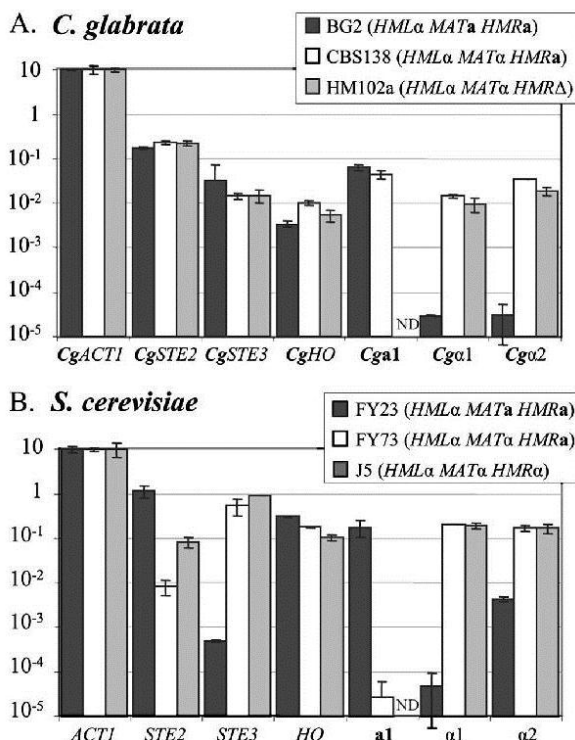


FIG. 2. qRT-PCR experiments with several genes related to mating. Histograms of transcript quantity per cell relative to the quantity of the actin transcript (fixed at 10 transcripts per cell [21]) in *C. glabrata* (A) and *S. cerevisiae* (B). Names of genes are indicated below the histograms; for *C. glabrata*, *CgACT1* is CAGL0K12694g, *CgSTE2* is CAGL0K12430g, *CgSTE3* is CAGL0M08184g, *CgHO* is CAGL0G05423g, *Cga1* is CAGL0E00341g, *Cga1* is CAGL0B01243g, and *Cga2* is CAGL0B01265g. The y axis is in the logarithmic scale. In each case, three different strains were analyzed as indicated in the boxes. ND, not detectable (a qRT-PCR experiment was performed, but since there is no corresponding sequence in the genome, no product was detected, as expected).

siae, when the *a1* transcript is not spliced, the *a1* protein is not produced (22). The *a1* gene from *C. glabrata* contains two introns, as in *S. cerevisiae*, and four primer pairs were designed for each species in order to analyze the splicing of both introns (Fig. 3A).

As shown on Fig. 3B, in *S. cerevisiae* *MATα* cells (FY23), the size of the only cDNA band amplified around intron 1 corresponds to the spliced transcript; i.e., splicing is total, whereas for intron 2, some unspliced forms remain, although most transcripts are spliced. In *C. glabrata* cells, for both introns, the major cDNA band has the same size as the genomic DNA band. Minor cDNA bands corresponding to the predicted spliced forms of 84 and 70 bp are observed only in *MATα* cells (BG2, M2, M3). In *C. glabrata* *MATα* cells (CBS138, M4, M5), no spliced form from either intron can be detected. Amplification of the fragment of the transcript that contains both introns with the external primers (Fig. 3C) shows that, in BG2 *MATα* cells, the doubly spliced form of the *a1* transcript exists, although unspliced transcripts are more abundant and transcripts with only one intron spliced also exist. In the latter case, we cannot distinguish between transcripts spliced for intron 1

or for intron 2 because there is only 2 nucleotides' difference in size between the two introns and therefore between the two transcripts. The band of larger size than that of the unspliced *a1* transcript is assumed to be a PCR artifact, as its presence is variable and as larger bands are also sometimes detected in the *S. cerevisiae* experiments.

In conclusion, in *C. glabrata*, the *a1* transcript is partially spliced in the *MATα* strains examined, while it is not spliced at detectable levels in the *MATα* strains examined. Translation of the unspliced transcripts cannot give rise to a functional protein because there are in-frame stop codons in the first intron.

Response to pheromones. Since *C. glabrata* *MATα* and *MATα* strains express both α - and α -factor receptor genes (Fig. 2), we wondered whether cells were sensitive to mating pheromones. The *C. glabrata* genome contains two genes predicted to encode pheromone precursors. The predicted translation product of CAGL0C01919g contains a 12-amino-acid long peptide similar to the α -factor of *S. cerevisiae* (Fig. 4A) (7, 19). The predicted translation product of CAGL0H03135g contains three 13-amino-acid-long peptides similar to the α -factor of *S. cerevisiae* (Fig. 4B) (7, 24). Two peptides are identical, but one differs by 2 amino acids. We used the two different sequences as putative α -factors for *C. glabrata*, form A and form B. For the synthesis of the artificial pheromones, we assumed that posttranslational modifications that occur in *S. cerevisiae* also occur in *C. glabrata* since the genes involved in these processes are conserved (7). These include precursor proteolysis of both pheromones and farnesylation and methylation at the C terminus of the α -factor (4).

We tested *C. glabrata* mating pheromones on *S. cerevisiae* cells, and we included *sst1* and *sst2* deletion mutants of *S. cerevisiae* because they exhibit greater sensitivity to pheromones (2). The *SST1* gene, whose standard name is *BARI*, encodes an aspartyl protease secreted into the periplasmic space of *MATα* cells that inactivates α factor. Thus, its action is mating type specific, as shown below. *SST2* encodes a G protein regulator that is required to prevent receptor-independent signaling of the mating pathway. We constructed *sst2* mutants (deletion of CAGL0H00374g) in *C. glabrata* cells of both mating types to check for increased sensitivity.

Null *sst2* mutants of *S. cerevisiae* shmoo constitutively, even in absence of cells of the opposite mating type, and this results in a longer generation time compared to that of the wild type. We observed no constitutive shmooing of *sst2* mutants of *C. glabrata* when grown in YPD or SC medium.

The effect of synthetic pheromones on *C. glabrata* and *S. cerevisiae* cells is shown in Fig. 5. Drops of synthetic pheromones were put on minimal medium agar plates, and cells were spread after absorption. As shown, form A of the *C. glabrata* α -factor is active on wild-type, *sst1*, and *sst2* *MATα* *S. cerevisiae* cells. Form B is active only on the hypersensitive *S. cerevisiae* *sst2* cells. Neither form is active on either wild-type or *sst2* *C. glabrata* *MATα* cells. The synthetic α -factor deduced from the genome of *C. glabrata* has no activity on wild-type *S. cerevisiae* *MATα* cells or on *sst1* cells but has a very strong effect on *sst2* cells. It has no observable activity on either wild-type or *sst2* *C. glabrata* *MATα* cells. The strain of *C. glabrata* with *HMRa* deleted does not respond to pheromones any more than the original CBS138 strain. Thus, *C. glabrata* cells are potentially able to produce active pheromones to which *S. cerevisiae* cells

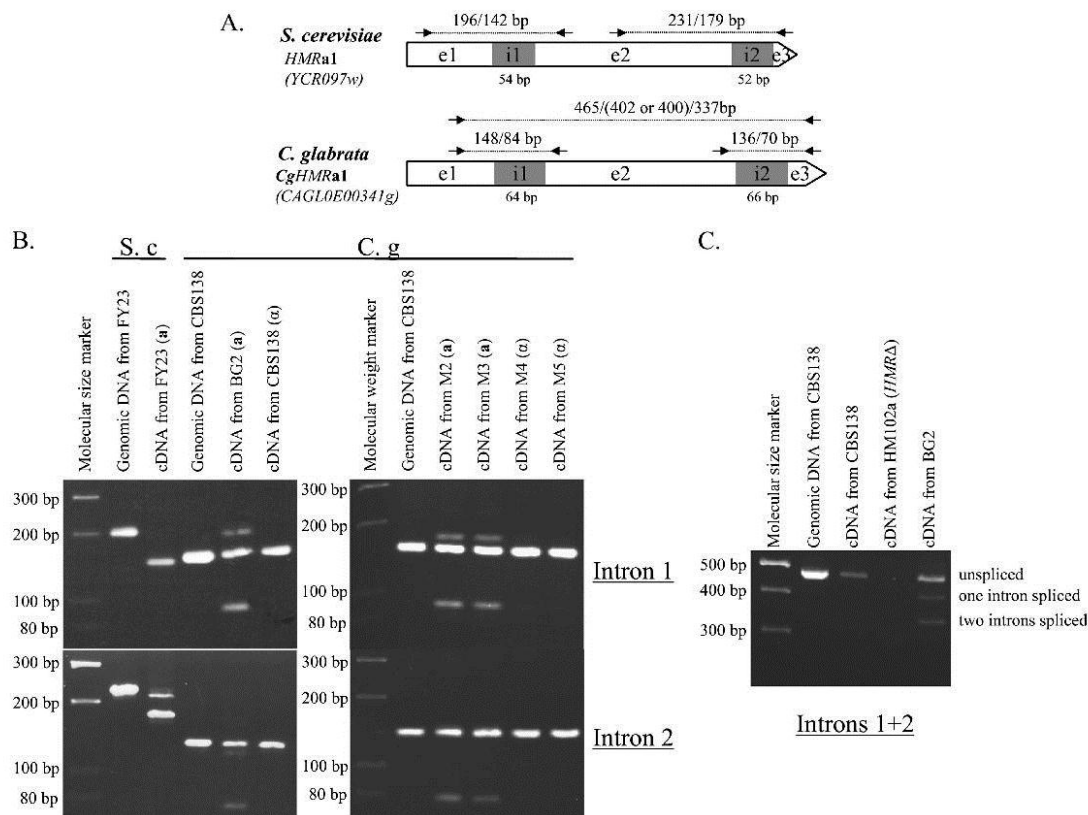


FIG. 3. Splicing of *a1* introns in *S. cerevisiae* and *C. glabrata*. (A) In representations of genes, white boxes are exons (e1 is exon1, e2 is exon2, and e3 is exon3) and gray boxes are introns (i1 is intron1 and i2 is intron2); their sizes are indicated below the diagrams. Arrows indicate positions of primers relative to introns used in RT-PCR, and the sizes of the PCR products from the cDNAs originating from nonspliced/spliced mRNAs between pairs are noted above the lines for the PCR. (B) RT-PCR experiments to detect splicing of individual introns in *S. cerevisiae* (S. c) and *C. glabrata* (C. g). (C) RT-PCR experiments to detect splicing of both introns in *C. glabrata*.

are sensitive but are themselves insensitive to them. Interspecific sensitivity to α -factor between *S. cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, and *Saccharomyces exiguus* has been described previously (14, 18), but the peptidic sequences of α -factors from *C. glabrata* are more diverged from *S. cerevisiae* than are the α -factors from *S. kluyveri* and *S. exiguus* (5 to 6 amino acids conserved out of 13 for *S. cerevisiae* versus 7 to 9 amino acids conserved out of 13 for *S. kluyveri* and *S. exiguus*). Despite this divergence, the sensitivity of *S. cerevisiae* to α -factor from *C. glabrata* is mediated by the Ste2 receptor, as *ste2* mutants of *S. cerevisiae* do not respond to it or to α -factor from *S. cerevisiae* (not shown). We then asked whether *C. glabrata* cells actually produce pheromones, using *S. cerevisiae* as a test.

Pheromone production by *C. glabrata*. To test pheromone production, *C. glabrata* and *S. cerevisiae* cell lawns were plated on top of drops of filtered supernatants from late-log-phase cultures of *C. glabrata* and *S. cerevisiae* strains, as described above. The results (Fig. 6A) show that *S. cerevisiae* *sst2* mutants exhibit sensitivity to supernatants of cultures from *S. cerevisiae* cells of opposite mating types. Due to the limited concentration of pheromones in the supernatant, no effect is observed on wild-type cells. In contrast, no supernatant from *C. glabrata* has a mating type-

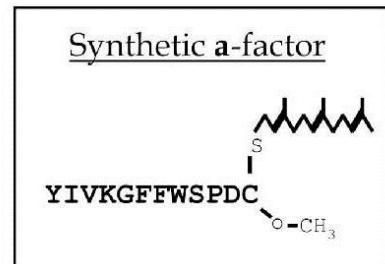
specific inhibitory effect on wild-type or *sst2* mutants of *S. cerevisiae*. However, this assay reveals the inhibitory effect of the CBS138 supernatant on all cell types (see below).

Figure 6B shows that *C. glabrata* cells are insensitive to the culture supernatants of both *S. cerevisiae* *MATa* and *MAT α* strains and *C. glabrata* *MATa* strains (BG2). The inhibition of the growth of *MATa* cells by the *C. glabrata* *MAT α* CBS138 supernatant cannot be taken as a mating type-specific effect, as this supernatant inhibits the growth of mating type cells of *C. glabrata* of both types (not shown) (but not of mating type cells of itself or derived strains) and of mating type cells of *S. cerevisiae* of both types, as explained above. Thus, strain CBS138 produces an inhibitor of the growth of other strains as the "killer" strains of other yeast species (17). This effect is observed when supernatants of rich medium cultures but not minimal medium cultures are used (not shown).

We then extended this growth inhibition assay to detect pheromone production to a collection of *C. glabrata* clinical isolates that we characterized independently, of which 80% are *MATa* (C. Hennequin, H. Muller, B. Dujon, and C. Fairhead, unpublished data). This collection contains 182 isolates that were grown in 96-well plates. Supernatants were filtered and

A. a-factor

YPL145w MQPITTASTQATQKDKSSEKKNYIIKGLFWDPACVIA
 YDR461w MQPST--ATAAPKEKTSSEKKNYIIKGVFWDPACVIA
 CAGL0C01919g MQPTI----EATQKDNTOEKRDNYIVKGFFWSPDCVIA
 *** * : : : : : * : : : : : * : : : : : *



B. α-factor

YPL187w MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVLFPFSNSTN
 YGL089c MKFISTFTLFIILAAVSVTAS-----SDEIAQVPAEAIIGYLDFFGGHDIAFLPFSNATA
 CAGL0H03135g MRFLRFISTVALLITGLATAQPVGEELGETVEVPSEAFIYGDFGATNDVAILPISNKTN
 * : * : : : : : : : : : : * : : : : : * : : : : : *

YPL187w NGLLFINTTIIASIAAK-EEGVSLDKREAEAWHWLQLKPGQPMYKREAEAEAWHWLQLKPG
 YGL089c SGLLFINTTIIAEAAEK-EQNTTLAKR-----EAVADAHHWLNLRPG
 CAGL0H03135g NGLLFVNTTLYNQATKGEKLSDFTKRDAN-----PDAAEAHHWVKIRKG
 . * * * : : : * : : : : : : : : : : : * : : : : : *

YPL187w QPMYKREAA-----EAWHWLQLKPGQPMYKREAA-----EAWHWLQLKPGQPMY
 YGL089c QPMYKREANA-----DAHWLQLKPGQPMY-----DAHWLQLKPGQPMY
 CAGL0H03135g QGLFRSADASPEAEAWHWVRLRKGQGLFRSADASPEAEAWHWVRLRKGQGLF
 * : : * : : * : : : : : * : : : : : *

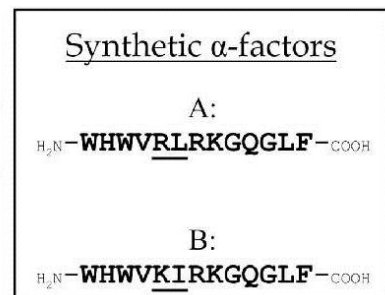


FIG. 4. Mating pheromones. (A) On the left, alignments of sequences of precursors of the a-factors of *S. cerevisiae* and *C. glabrata* are shown. The box indicates peptides resulting from precursor proteolysis. On the right, the synthesized form of the a-factor of *C. glabrata* is shown. This is modified with a methyl and a farnesyl group at the C terminus. (B) On the left, alignments of sequences of precursors of the α-factors of *S. cerevisiae* and *C. glabrata* are shown. The boxes indicate peptides resulting from precursor proteolysis (forms A and B). On the right, synthesized forms of the α-factors of *C. glabrata* are shown. In the alignments: “*,” identical residues; “:,” highly similar residues; “.” similar residues.

spotted before *sst2* *S. cerevisiae* tester cells were plated. No isolate was found to produce pheromones specifically inhibiting the *MATa* or *MATα sst2* strains of *S. cerevisiae*, but three unrelated strains (two *MATa* strains and one *MATα* strain) were found to express the same general inhibitor as CBS138 (not shown).

DISCUSSION

The reason why sexual reproduction is so common in living species remains debated, and many species in which clonal propagation is possible get by without it. This is particularly true in the fungal kingdom, where lack of an observed sexual stage is often associated with pathogenic interactions with humans or plants or with obligatory symbiosis with plant species. In this work we have examined the reasons why no teleomorph has been observed in the hemiascomycete *C. glabrata* despite the presence of genes homologous to those known to be involved in mating (7, 26, 31). We have observed several differences in the mating pathway from that of *S. cerevisiae*.

First, our results show that α1 and α2 are expressed in a mating type-specific manner, in contrast to a1, which is expressed in both mating types, because of a lack of silencing at *HMRa*, interestingly situated on a different chromosome than *MAT* and *HMLα*. Sir1p is responsible for silencing *HML/HMR* loci in *S. cerevisiae*; thus, perhaps the absence of a *SIR1* homolog in *C. glabrata* (7) explains this phenomenon. Nonetheless, *HMLα* is silenced in *MATa* strains, in which we do not observe the expression of the α genes.

Even though the expression of the a1 gene is not subject to

mating type specificity, experiments suggest that a1 is not functional in *MATα* haploid cells. Moreover, the expression of a functional a1 gene in *MATα* cells would logically lead them to behave as diploid cells, with the risk of their trying to undergo meiosis, a possibly fatal event for a haploid cell. Even though we do not know which conditions could induce meiosis in *C. glabrata*, it is likely that they would be met at some point by cells. This hypothesis is in accordance with the fact that only haploid cells are ever isolated, so that if diploid cells are formed, they must sporulate readily. In *S. cerevisiae* diploid cells, the coexpression of a1 and α2 leads to the repression of α1 in addition to other haploidy genes. The expression of the three transcription factors a1, α1, and α2 simultaneously in *C. glabrata* *MATα* cells thus leads to the hypothesis that a1 is not functional. Additionally, the observation that the *HMRaΔ MATα* strain still expresses a1, *STE2*, and *STE3*, like the wild-type *MATα* strain, strengthens this hypothesis. The fact that we found that the splicing of the a1 transcript is detectable only in *MATa* cells can explain these observations. In *S. cerevisiae*, it has been shown that the unspliced form of a1 is not functional in diploid cells (22). In haploid cells, there is no known role for a1, the *MATa* phenotype being the default one. Thus, a partial failure to splice the a1 transcript in *MATa* cells is not expected to have any effect. In *MATα* cells, the lack of splicing of the a1 transcript may be necessary to compensate for the leakage of expression from *HMR* by functionally inactivating the transcript from the rogue gene. Alternatively, complete silencing may not be necessary because a1 expression is regulated in

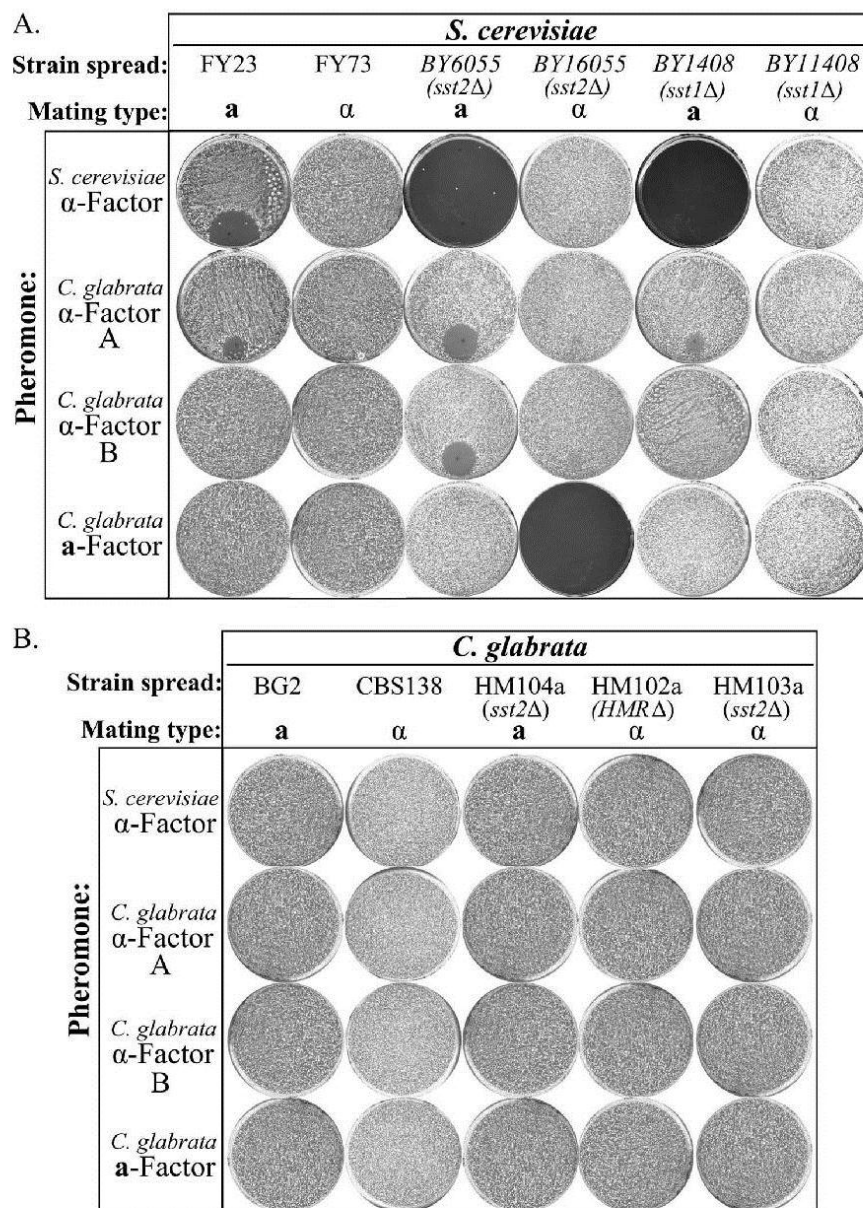


FIG. 5. Effect of synthetic pheromones on *S. cerevisiae* (A) and *C. glabrata* (B) cells. Cell type is indicated at the top, and pheromones are indicated on the left.

some other way, such as splicing. Since there is no sequence difference between *MATa1* and *HMRa1* that would explain differences in splicing efficacy (6, 26), the differential splicing must originate either from a general splicing defect in *MATa* strains or from a mating type-specific mechanism, with both alternatives leading to the inactivation of *a1*.

The pheromone receptor genes *STE2* and *STE3* (CAGL0K12430g and CAGL0M08184g) are expressed in both cell types in *C. glabrata*, while in *S. cerevisiae*, *STE3* is highly regulated and *STE2* less tightly regulated. In *S. cerevisiae* *MATa* cells, *STE3* is

activated by *a1*. In *C. glabrata*, the basal level observed in *MATa* cells is higher than in *S. cerevisiae* (100-fold, if we assume that the actin transcript is expressed at similar levels in both species) and there is no activation by *a1*. In *S. cerevisiae* *MATa* cells, *STE2* is repressed by the binding of Mcm1 and *a2* on the *a*-specific gene operator. Putative binding sites for Mcm1 and *a2* are found upstream of the homolog of *STE2* in *C. glabrata*, but their spacing is different from *S. cerevisiae*'s. This suggests that the expression of this gene could be mating type specific under some as-yet-undefined conditions (28; B. Tuch, personal communication).

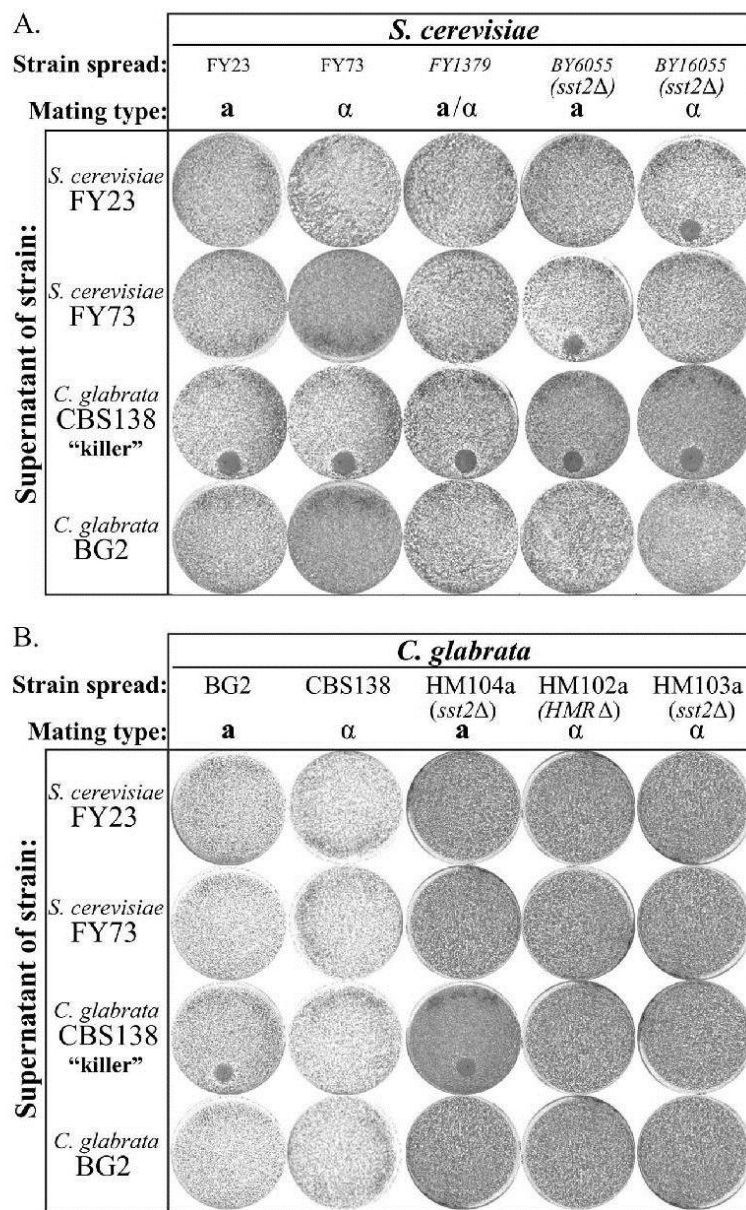


FIG. 6. Effect of culture supernatant on *S. cerevisiae* (A) and *C. glabrata* (B) cells. Cell type is indicated at the top, and the nature of the supernatant is indicated on the left.

The expression of both receptors in *C. glabrata* does not make the cells sensitive to both pheromones, as our tests with artificial pheromones show. Furthermore, there is no pheromone production detectable in standard laboratory culture in our primitive test. Nonetheless, pheromones synthesized using the genome sequences of *C. glabrata* are active on *S. cerevisiae* cells. The genes encoding factors that modify the pheromones are also found in the genome of *C. glabrata*. Thus, *C. glabrata* has retained its ability to encode active pheromones but does not respond to them, possibly because the signal cascade leading to the G₁-S cell cycle

arrest in *S. cerevisiae* does not properly operate in *C. glabrata*. This is consistent with the absence of the shmooing of *sst2* mutants of *C. glabrata*. Alternative explanations of the absence of a pheromone response in *C. glabrata* are that pheromones are expressed under some unknown conditions and that some additional regulation of the signal cascade exists in *C. glabrata*, allowing for a mating type-specific response to the opposite mating pheromone.

We also show that the *HO* gene is transcribed in *C. glabrata*. In *S. cerevisiae*, the *HO* endonuclease drives mating type switching by initiating a double-strand break at the *MAT* locus. This mech-

anism allows the creation of cells of opposite mating types in clonal populations, thus facilitating mating under conditions of isolation. Partially degenerate HO sites in *C. glabrata* (7) that match a previously published consensus sequence for the endonuclease from *S. cerevisiae* (TNNYGGC/ANC/AANT/G) can be identified (23). Indeed, HO from *S. cerevisiae* cuts the *MATa* site but not the *MAT α* site of *C. glabrata* (our unpublished results). In vivo mating type switching events have been reported to occur in *C. glabrata* (1, 16), always from *MATa* to *MAT α* . In *Kluyveromyces fragilis*, where the loci are organized as in *C. glabrata* (7), switching is also more likely from a to α than the other way around (11). These observations lead to two hypotheses. The first is that HO from *C. glabrata* is active and has the same specificity as the one from *S. cerevisiae*, so that the endonuclease is able to recognize and cut only *MATa* sites, not *MAT α* sites. In this case, activity must be infrequent to account for the three- to fourfold predominance of *MATa* strains (26; C. Hennequin, H. Muller, B. Dujon, and C. Fairhead, unpublished data). This predominance could also be explained by a better fitness of *MATa* strains than that of *MAT α* strains, a possibility that needs to be tested. The second hypothesis is that HO is inactive in *C. glabrata*, and switching from *MATa* to *MAT α* is an uncontrolled event that is more likely than *MAT α* -to-*MATa* switching because of the chromosomal configuration of the cassettes. In the latter case, there would be no active control of switching and therefore potential mating, but with the first hypothesis, the possibility of a yet-unproved active control of switching is open, perhaps in the human body, as suggested previously (25).

In conclusion, although our experiments to mate *C. glabrata* have failed, the facts that (i) so many genes of the mating pathway remain in the genome, (ii) the modes of splicing of the *a1* transcript differ between mating types (this study), and (iii) this would have no cause to arise unless some mating/meiosis pathways are at least partially active indicate that it is possible that *C. glabrata* cells mate under some still-to-be-discovered conditions, such as in the human body. This could be followed by a diploid phase that may be transient, allowing for meiotic or pseudo-meiotic recombination to occur, as in *C. albicans* (25).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Génolevures consortium and members of the Unité de Génétique Moléculaire des Levures, in particular, Bertrand Llorente and Alain Jacquier, for stimulating discussions. We thank Brian Tuch for critical reading of the manuscript and sharing of unpublished information.

This work was supported in part by ACI grants MIC0314, GDR 2354, and ANR GENARISE. B.D. is a member of the Institut Universitaire de France. H.M. is a recipient of a doctoral fellowship of the Ministère de la Recherche through University Paris 6 and of a final-year fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

1. Brockert, P. J., S. A. Lachke, T. Srikantha, C. Pujol, R. Galask, and D. R. Soll. 2003. Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. *Infect. Immun.* 71:7109–7118.
2. Chan, R. K., and C. A. Otte. 1982. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and a factor pheromones. *Mol. Cell. Biol.* 2:21–29.
3. Chanfreau, G., G. Rotondo, P. Legrain, and A. Jacquier. 1998. Processing of a dicistronic small nuclear RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *EMBO J.* 17:3726–3737.
4. Chen, P., S. K. Sapperstein, J. D. Choi, and S. Michaelis. 1997. Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone α -factor. *J. Cell Biol.* 136:251–269.
5. Cornack, B. P., and S. Falkow. 1999. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151:979–987.
6. Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neugeglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boismare, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioli, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fahre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jaumaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Kozul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Ostas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pelenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Teklaia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Boletín-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J. L. Souciet. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:35–44.
7. Fabre, E., H. Muller, P. Therizols, I. Lafontaine, B. Dujon, and C. Fairhead. 2005. Comparative genomics in hemiascomycete yeasts: evolution of sex, silencing, and subtelomeres. *Mol. Biol. Evol.* 22:856–873.
8. Fairhead, C., B. Llorente, F. Denis, M. Soler, and B. Dujon. 1996. New vectors for combinatorial deletions in yeast chromosomes and for gap-repair cloning using 'split-marker' recombination. *Yeast (Chichester)* 12:1439–1457.
9. Fidel, P. L., Jr., J. L. Cutright, L. Tait, and J. D. Sobel. 1996. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J. Infect. Dis.* 173:425–431.
10. Fraser, J. A., and J. Heitman. 2004. Evolution of fungal sex chromosomes. *Mol. Microbiol.* 51:299–306.
11. Herman, A., and H. Roman. 1966. Allele specific determinants of homothallism in *Saccharomyces fragilis*. *Genetics* 53:727–740.
12. Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52:536–553.
13. Herskowitz, I., J. Rine, and J. N. Strathern. 1992. Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*, p. 583–656. In E. W. Jones, J. R. Pringle, and J. R. Broach (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*, vol. II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
14. Hisatomi, T., N. Yanagishima, A. Sakurai, and H. Kobayashi. 1988. Inter-specific actions of alpha mating pheromones on the a mating-type cells of three *Saccharomyces* yeasts. *Curr. Genet.* 13:25–27.
15. Kurtzman, C. P., and J. W. Fell (ed.). 2000. *The yeasts: a taxonomic study*, 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
16. Lin, C. Y., Y. C. Chen, H. J. Lo, K. W. Chen, and S. Y. Li. 2007. Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 45:2452–2459.
17. Marquina, D., A. Santos, and J. M. Peinado. 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5:65–71.
18. McCullough, J., and I. Herskowitz. 1979. Mating pheromones of *Saccharomyces kluyveri*: pheromone interactions between *Saccharomyces kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 138:146–154.
19. Michaelis, S., and I. Herskowitz. 1988. The α -factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol. Cell. Biol.* 8:1309–1318.
20. Muller, H., C. Hennequin, B. Dujon, and C. Fairhead. 2007. Ascomycetes: the *Candida MAT* locus: comparing *MAT* in the genomes of hemiascomycetous yeasts, p. 247–266. In J. Heitman, J. W. Kronstad, J. W. Taylor, and L. A. Casselton (ed.), *Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications*. ASM Press, Washington, DC.
21. Needleman, R. B., D. B. Kaback, R. A. Dubin, E. L. Perkins, N. G. Rosenberg, K. A. Sutherland, D. B. Forrest, and C. A. Michels. 1984. *MAT6* of *Saccharomyces*: a complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2811–2815.
22. Ner, S. S., and M. Smith. 1989. Role of intron splicing in the function of the *MATa1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9:4613–4620.
23. Nickoloff, J. A., J. D. Singer, and F. Heffron. 1990. In vivo analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* HO nuclease recognition site by site-directed mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10:1174–1179.
24. Singh, A., E. Y. Chen, J. M. Lugovoy, C. N. Chang, R. A. Hitzeman, and P. H. Seeburg. 1983. *Saccharomyces cerevisiae* contains two discrete genes coding for the alpha-factor pheromone. *Nucleic Acids Res.* 11:4049–4063.
25. Soll, D. R., S. R. Lockhart, and R. Zhao. 2003. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 2:390–397.
26. Srikantha, T., S. A. Lachke, and D. R. Soll. 2003. Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot. Cell* 2:328–340.
27. Thierry, A., C. Fairhead, and B. Dujon. 1990. The complete sequence of the 8.2 kb segment left of *MAT* on chromosome III reveals five ORFs, including a gene for a yeast ribokinase. *Yeast (Chichester)* 6:521–534.
28. Tsong, A. E., B. B. Tuch, H. Li, and A. D. Johnson. 2006. Evolution of alternative transcriptional circuits with identical logic. *Nature* 443:415–420.
29. Weig, M., K. Haynes, T. R. Rogers, O. Kurzi, M. Frosch, and F. A. Mühlschlegel. 2001. A GAS-like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology (Reading)* 147:2007–2019.
30. Winston, F., C. Dollard, and S. L. Ricupero-Hovasse. 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast (Chichester)* 11:53–55.
31. Wong, S., M. A. Fares, W. Zimmermann, G. Butler, and K. H. Wolfe. 2003. Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol.* 4:R10.

AUTHOR'S CORRECTION

The Asexual Yeast *Candida glabrata* Maintains Distinct α and α Haploid Mating Types

Héloïse Muller, Christophe Hennequin, Julien Gallaud, Bernard Dujon, and Cécile Fairhead

Institut Pasteur, Unité de Génétique Moléculaire des Levures, CNRS URA 2171, Université Pierre et Marie Curie—Paris 6 UFR927, F75015 Paris, France, and Université Pierre et Marie Curie—Paris 6 UMR511, INSERM, Faculté de Médecine St.-Antoine, Parasitologie-Mycologie, F75012 Paris, France

Volume 7, no. 5, p. 848–858, 2008. Pages 856 and 857: The authors retract Fig. 5 and Fig. 6 from the original version of the article because the same pictures of some of the plates with negative results were mistakenly used at several distinct places in the figures. The correct versions of these figures and their legends are provided below. The conclusions of the paper remain the same.

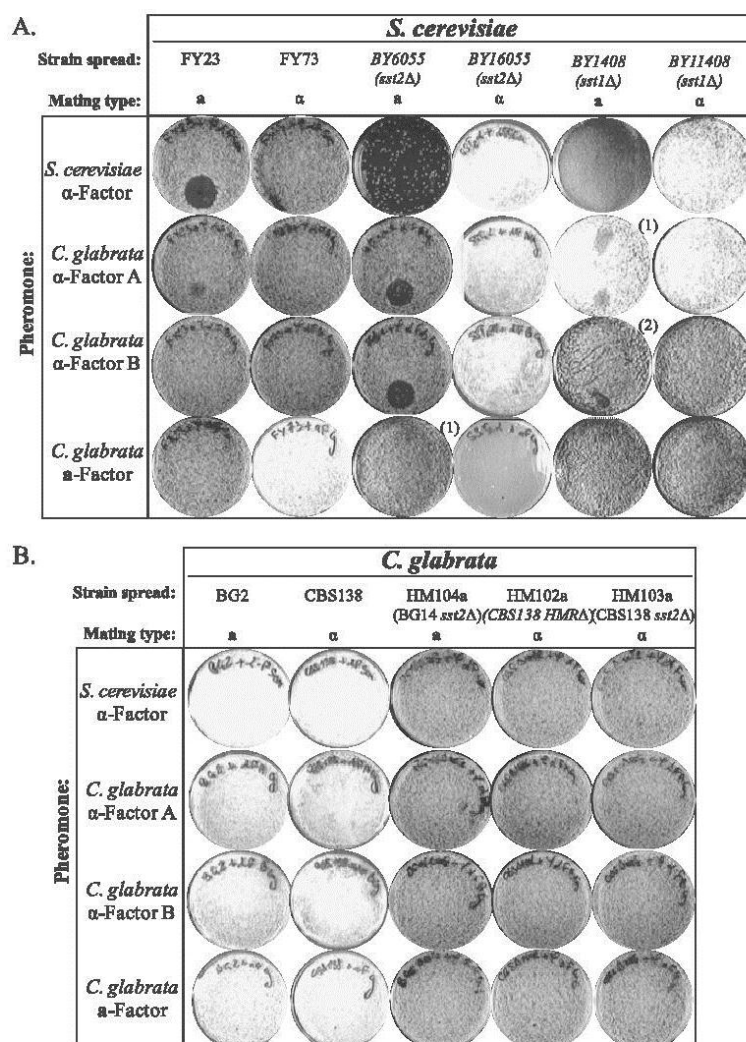


FIG. 5. Effect of synthetic pheromones on *Saccharomyces cerevisiae* (A) and *Candida glabrata* (B) cells. Assays were performed as indicated in Materials and Methods. Cell type is indicated at the top, and pheromones are indicated on the left. [Notes: (i) on this plate, two drops of pheromone solutions were deposited, with the top one corresponding to a higher concentration (1 mg/ml solution); (ii) the halo at the bottom of the plate is due to an artifact during plate handling and does not indicate growth arrest.]

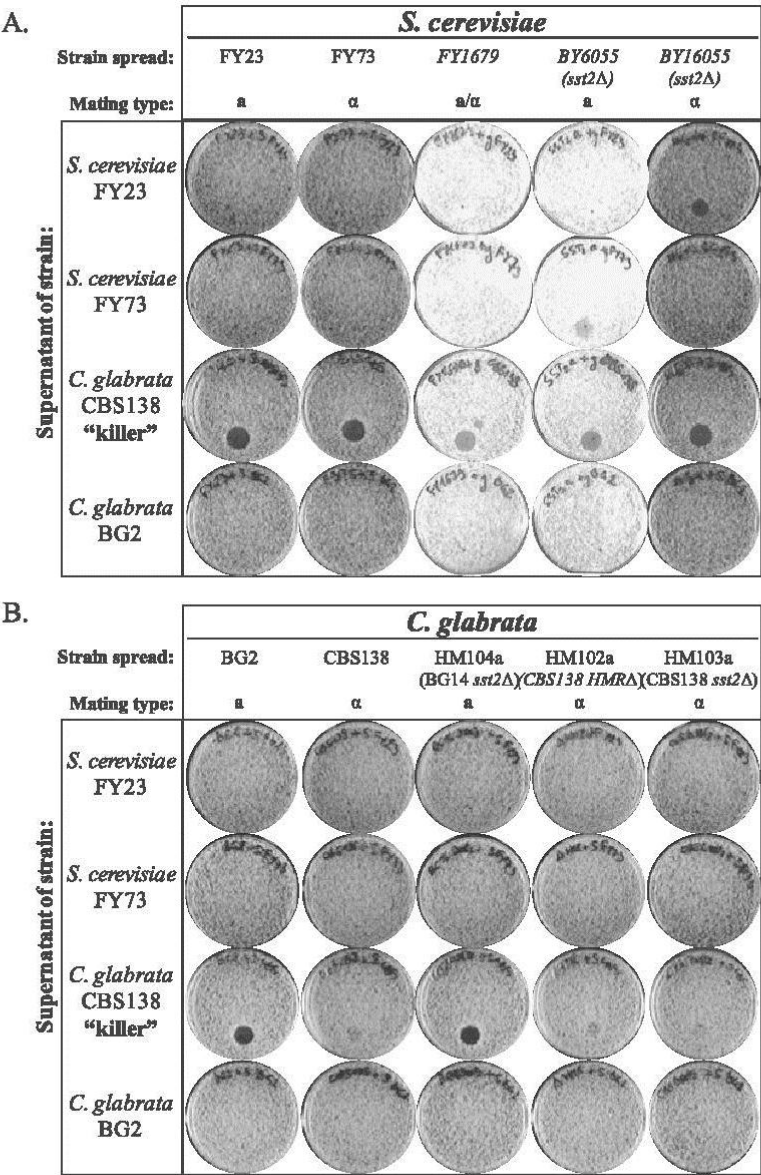


FIG. 6. Effect of culture supernatant on *S. cerevisiae* (A) and *C. glabrata* (B) cells. Assays were performed as indicated in Materials and Methods. Cell type is indicated at the top, and the nature of the supernatant is indicated on the left.